基于功能纳米材料的蛋白激酶活性分析新方法

李培, 刘欣, 向彬彬, 韩逸陶, 李永, 曾姝, 聂舟*, 姚守拙

化学生物传感与计量学国家重点实验室; 湖南大学化学与化工学院, 长沙 410082

*通讯作者, E-mail: niezhou.hnu@gmail.com

收稿日期: 2015-06-02; 接受日期: 2015-06-20; 网络版发表日期: 2015-09-17

doi: 10.1360/N032015-00086

摘要 蛋白激酶催化的蛋白质磷酸化是生物体内最普遍、最重要的翻译后修饰形式之一, 磷酸化异常通常会引发包括癌症在内的多种疾病. 而蛋白激酶作为细胞内信号转导通路的关键组成部分, 参与调节细胞生长、代谢、分化及增殖等一系列重要的生理过程. 因此发展激酶的高效特异的检测手段, 对于生物化学基础研究、临床诊断以及药物开发均具有重要意义. 近年来, 随着纳米技术研究的逐步深入, 越来越多的功能纳米材料被用于蛋白激酶传感器构建. 纳米材料由于其优异的光、电、化学以及催化性质, 在激酶传感的关键过程中发挥重要作用, 被广泛用于信号产生及转化、传感界面构建以及生化信号放大, 极大地提高了激酶生化分析的分析效能. 本文简要概括了激酶活性分析中常用的分子识别手段和检测原理, 进一步就纳米材料在激酶活性分析中的新方法进行了系统综述, 并对未来激酶活性分析方法的发展进行了展望.

关键词

蛋白激酶
纳米材料
生物传感
比色
荧光
电化学

1 引言

蛋白质翻译后修饰(post-translational modification, PTM)是指在 mRNA 被翻译成蛋白质后, 对其进行共价加工与化学修饰的过程. 基因转录、翻译所产生的蛋白质前体, 几乎都必须经过加工与再修饰, 才能最终成熟并成为具有完整生物功能及活性的蛋白质. 常见的 PTM 包括磷酸化、乙酰化、糖基化、甲基化、泛素化等^[1]. 其中蛋白质磷酸化作为调节和控制蛋白质活力的最基本、最普遍机制, 也是生物体中最有效、最重要的调控途径之一^[2]. 蛋白质磷酸化的具体过程是指在蛋白激酶(protein kinases)的催化下, 从三磷酸腺苷(ATP)末位(γ 位)转移磷酸并共价结合到特定蛋白质分子中某些丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的羟基基团上, 从而触发蛋白质功能、活性、胞内位置以及蛋白质相互作用等多方面变化. 蛋白激

酶在细胞信号转导过程中通过磷酸化调控蛋白质的构象及活性, 并通过逐级磷酸化过程实现信号放大, 最终调控细胞的多种行为及应激响应^[3].

可逆的磷酸化修饰由蛋白激酶和磷酸酶这对作用相反的酶系共同调控, 为多种生理过程提供了“开关”机制, 这些生理过程包含了代谢途径、激酶连锁激活、膜间运输、基因转录和启动机制, 从而调节着生命活动的整个过程, 如细胞增殖、发育和分化、细胞凋亡、神经活动、信号转导、肌肉收缩、新陈代谢、肿瘤发生等^[4]. 据估计, 哺乳动物细胞中的蛋白质, 在其基因表达过程中, 超过 30%发生过磷酸化. 人类基因组中包含有 500 余种蛋白激酶编码基因, 占整个基因组的近 2%^[5], 这些基因编码的激酶在细胞信号转导、细胞周期调控等系统中行使丰富的功能, 共同构成复杂而又调控精细的激酶调节网络. 因此, 理解蛋白激酶的活性调节、时序表达和时空分布一直是基

础生物化学研究的重要课题,它不仅有助于研究细胞内信号转导的分子机制,还对重大疾病的病理机制研究以及药物设计及研发的指导起着十分重要的作用。

鉴于蛋白激酶在生命活动及疾病病理中所具有的重要意义,发展蛋白激酶活性检测方法及其抑制剂筛选方法就显得尤为重要。放射性同位素标记法是最传统的评估蛋白激酶活性的分析方法之一^[6],它主要利用放射性元素 $\gamma^{32}\text{P}$ 标记的 ATP 作为底物进行磷酸化反应,分离出磷酸化多肽产物后通过闪烁计数定量激酶活性。放射性同位素标记法虽然灵敏、干扰小、通用性好,但同时存在放射性污染、操作步骤多、无法实时连续监测等问题。因此,这种传统手段逐步被基于比色、荧光、电化学、共振光散射及质谱等技术的新激酶分析方法所替代^[7]。

近年来,纳米技术已经成为分析化学学科中最前沿的技术手段之一,多种纳米材料,如纳米颗粒、纳米线、纳米管、纳米棒、纳米复合物和半导体量子点等,均在生物分析中得到广泛应用^[8,9]。纳米材料由于其纳米尺度(一般在 1~100 nm 范围内)及其独特结构,表现出与体材料截然不同的光学、电学、磁学以及化学性质,如表面效应、微尺寸效应、量子效应和宏观量子隧道效应等,在构建新型化学生物传感器方面具有独特的优势和广阔的应用前景。过去 10 年,这些具有高比表面积及优异理化性质的纳米材料逐步被引入到蛋白激酶的活性分析中来,不仅使得分析传感的选择性、灵敏度及重现性等方面得到了极大的改善,还产生了一系列纳米分析的新原理及新方法^[7]。本文旨在全面反映纳米材料应用于蛋白激酶活性分析的最新进展,在简要概括了常规激酶检测中的分子识别手段和原理的基础上,依据不同分析技术进行分类,系统综述了纳米材料在蛋白激酶活性分析中的各种新方法,并对基于纳米材料的激酶分析方法所面临的挑战及未来发展方向进行了初步展望。

2 蛋白激酶在癌症诊断及药物开发中的重要作用

对所有编码激酶的基因进行分析,结果显示,近 30 种肿瘤抑制基因和超过 100 种主要的致癌基因编码蛋白激酶^[10]。而由基因异常引起的蛋白激酶活性

失调通常会引发癌症、糖尿病、炎症、哮喘、免疫疾病以及高血压等许多重大疾病^[11,12]。鉴于此,激酶被认为是最重要的疾病治疗靶点之一。其中激酶与癌症的关系备受关注,由激酶介导的信号通路多与癌症的发生发展密切相关。分子病理学研究表明,癌症发生在很大程度上是由蛋白激酶过度活跃导致的。抑制过度的激酶活性,阻断反常的信号转导过程,从而阻止或减缓疾病的进一步发展,是目前抗肿瘤药物开发的主流策略^[13]。

据统计,在过去的 15 年里,蛋白激酶已成为制药行业最重要的抗癌药物靶标,全世界正在研究或开发的药物项目中约 1/3 与激酶相关。自 2001 年以来,美国食品和药物管理局(FDA)已批准了 9 个激酶抑制剂用于临床诊断,并且有数百个其他抑制剂正处于临床试验的不同阶段^[14,15]。与传统抗肿瘤化疗药物相比,激酶抑制剂作为一种分子靶向治疗药物,具有高效、低毒、特异性强等特点,是未来肿瘤治疗的主力军,据统计有 50%~70%的抗癌药物项目聚焦于各类激酶抑制剂。目前已经有一些激酶药物靶标被成功用于抗肿瘤药物的开发,包括 AGC 类的 PKC 家族和 EGFR 家族、TK 酪氨酸激酶类的 Abl 家族以及 VEGFR 家族。以 Abl 激酶为例,Abl 是首个靶向性药物 Gleevec 的靶标^[16]。早在 80 年代后期,研究逐步证实,慢性粒细胞白血病的病因是由于染色体异常产生了 Bcr-Abl 这一融合蛋白,通过连续发送异常的细胞增殖信号,直接引起白细胞数量急剧增加^[17]。所以,设计能够特异性抑制异常 Abl 激酶功能的小分子化合物是治疗慢性粒细胞白血病药物的关键。

总之,检测目标激酶的活性,并对其抑制剂进行定量评估,不仅有利于了解蛋白激酶的基本生化性质,而且为我们筛选针对目标蛋白激酶的候选药物提供了可能性。但不得不承认,尽管激酶组被认为是潜在药物靶点的丰富来源,但目前的研究仍主要集中于少部分激酶,只有 10%的激酶已经或正在进行与临床有关的评价^[18],仍远远不能满足抗肿瘤药物研发的迫切需求。因此,发展灵敏、高选择性和高通量的激酶检测方法并用于抑制剂筛选,对于疾病的诊断和治疗以及新药的开发都具有重要意义。而开发针对细胞提取物和活细胞中激酶活性分析的方法,可以为理解激酶信号级联的功能网络提供全面、有意义的信息。

3 蛋白激酶分子识别机理

蛋白激酶的生物传感建立在对蛋白激酶进行有效生物识别的基础上. 研究者从激酶催化的磷酸化反应出发, 紧密围绕磷酸化产物识别、共反应物 ATP 标记以及蛋白激酶的直接识别三个方面, 发展了一系列蛋白激酶的高效识别手段(图 1), 概括为以下三类: (1) 通过对磷酸化产物进行识别并定量, 从而反映激酶活性高低, 是最普遍的一类激酶检测方法; 对磷酸化产物的识别机制包括基于特异性识别蛋白的生物识别(抗体或蛋白结构域)、金属离子及氧化物对于磷酸基团的化学亲和作用, 以及磷酸化多肽自身的物化及生物性质改变; (2) 由于磷酸化反应伴随着 ATP 的 γ 位磷酸基团的迁移并共价修饰于底物上, 相应会在产物磷酸化多肽上引入特定信号标记, 从而实现激酶检测; (3) 此外一类新兴的识别方式是通过类适配体多肽对活性激酶的特异性结合作用实现激酶的直接定量分析.

3.1 基于磷酸化产物的特异性识别

3.1.1 通过特异性抗体或者蛋白结构域选择性识别磷酸化位点

利用特异性抗体或者蛋白结构域选择性识别多肽磷酸化位点, 通过抗体或蛋白结构域与磷酸化多

肽结合前后标记物信号的改变实现激酶活性分析, 这是最常规的激酶检测方法. 基于磷酸化特异性抗体识别的常规检测方法一般通过免疫印迹技术检测磷酸化修饰的程度^[19]. 在此基础上出现了商品化的酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒, 用于检测蛋白激酶活性, 这在一定程度上促进了蛋白激酶的高通量研究. 但是抗体识别仍然有一定的局限, 如抗丝、苏氨酸磷酸化抗体的抗原决定簇较小, 抗原抗体的结合位点空间阻碍大, 且并非绝对专一; 此外, 免疫方法往往涉及固定、清洗及染色等复杂步骤, 无法实时原位分析, 尤其是细胞水平的激酶活性实时动态分析.

特定的磷酸化识别结构域是另一种常见的磷酸化识别蛋白工具. 在激酶分析中, SH2 结构域(Src homology 2 domain)是一种代表性的磷酸化识别结构域, 其蛋白序列由约 100 个氨基酸残基组成, 它能够特异性结合受体酪氨酸激酶的磷酸化酪氨酸残基, 同时识别其 C 端的 3~5 个氨基酸残基, 形成多蛋白的复合物. 研究表明, SH2 结构域在生物体内广泛存在, 其主要功能是介导胞浆内多种信号蛋白的相互连接, 一个蛋白含有的 SH2 结构域与另一蛋白上的磷酸化酪氨酸残基直接相互作用形成蛋白异聚体复合物, 并通过酪氨酸残基的磷酸化或去磷酸化得到调控, 最终实现信号传递^[20]. 类似地, 14-3-3 是另一类在信号转导过程中发挥重要作用的蛋白. 它可以与含有

图 1 蛋白激酶分子识别机理

磷酸化丝氨酸或苏氨酸的肽段特异结合 ($K_d < 100$ nmol/L), 从而在细胞周期、凋亡介导及信号转导等多种生理过程中发挥重要作用^[21].

基于以上特点, Tsien 课题组最早基于 SH2^[22]与 14-3-3^[23]结构域对磷酸化多肽的特异性识别和结合, 引起青色荧光蛋白(CFP)与黄色荧光蛋白(YFP)之间的有效荧光共振能量转移(FRET), 从而实现了细胞内激酶活性的直接检测. Lawrence 课题组也开展了一系列开创性的工作, 通过在底物多肽磷酸化酪/丝氨酸位点附近修饰荧光基团或猝灭基团, 磷酸化引发 SH2^[24]及 14-3-3^[25]结构域的特异识别, 结构域结合引起疏水环境及位阻的显著改变, 进而导致荧光强度发生可观的变化, 并基于此实现激酶活性的高特异性检测.

3.1.2 基于金属离子或金属氧化物对磷酸化多肽的特异性识别作用

近年来, 用于富集或纯化磷酸化蛋白与多肽的亲合材料研究已经取得了令人瞩目的成绩, 在很大程度上促进了蛋白激酶传感的迅猛发展. 不少科研工作者正是利用磷酸化多肽的富集技术开发了新的思路用于研究蛋白激酶活性及抑制剂筛选.

一些金属离子, 如 Cu^{2+} 、 Ti^{4+} 、 Fe^{3+} 、 Ga^{3+} 、 Zr^{4+} 等, 在 pH 较小时, 可选择性地与带负电的磷酸基团通过静电及配位等相互作用而紧密结合, 从而实现磷酸化多肽的有效富集; 而在 pH 较高时或在含磷酸盐的介质中, 这种相互作用被破坏, 富集的磷酸化多肽重新被释放^[26]. 相应地, 一些金属氧化物如 TiO_2 、 ZrO_2 、 Al_2O_3 、 ZnO 、 HfO_2 、 Fe_2O_3 等对磷酸基团也具有特异识别功能, 但它们富集磷酸化肽的机理研究仍然不够明晰. 一般认为, 这些金属氧化物由于表面原子价态不饱和而具备两性, 即在高 pH 下表现为路易斯碱, 而在低 pH 时表现为路易斯酸, 因此可以与磷酸根可逆结合, 从而被用于磷酸化多肽的有效富集^[27].

鉴于上述离子及氧化物在磷酸化肽选择性富集中的成功应用, 分析化学研究者逐步将其引入到激酶传感器的设计中. 例如, Willner 课题组^[28]通过末端半胱氨酸残基将底物多肽组装在金电极上, 激酶催化磷酸化后, 利用 Ag^+ 对磷酸基的亲合吸附, 在电极表面直接用方波伏安法(SWV)检测 Ag^+ 的电化学还原峰电流, 依此用于酪蛋白激酶(CKII)的免标记检测.

近几年, 市场上出现了一些新的技术和产品, 可

实现磷酸化蛋白及激酶的灵敏检测. 磷酸化识别标签 Phos-tag^{TM}便是其中的一种. 它最初由日本广岛大学开发, 后由 Wako 公司商业化, 在生理 pH 条件下, Phos-tag^{TM}能与磷酸离子特异性结合. 目前, 通过 Phos-tag^{TM}识别目标蛋白磷酸化片段而实现激酶的检测已被逐步采用, 如基于 Phos-tag^{TM}识别的磷酸化多肽染色用于聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 以及基于 Phos-tag^{TM}的电化学及光电化学激酶传感器^[29,30].

3.1.3 利用磷酸化前后多肽性质的改变实现激酶检测

多肽在蛋白激酶催化下发生的磷酸化反应, 会在底物多肽的丝氨酸、色氨酸或酪氨酸上引入一个磷酸基团, 由于磷酸基团立体位阻较大且带两个负电荷, 发生磷酸化的多肽在带电性和酶切性质上均发生了明显的改变. 近年来, 不少研究者利用多肽磷酸化后理化性质的变化这一特征, 开发了一系列蛋白激酶检测的新方法.

一种较常用的激酶检测原理是利用磷酸化前后的电荷变化进行检测. 例如, Kwon 课题组^[31]在带正电荷的聚合物 PEI 上同时修饰蛋白激酶的底物多肽 kemptide (GLSARRL)和近红外荧光素 Cy5.5, 该复合物通过静电吸附与阴离子型聚电解质 PAA 团聚形成稳定的聚合纳米粒子, 进而导致 Cy5.5 分子间短程荧光猝灭. PKA 催化的磷酸化后, 原有电荷平衡被破坏, 纳米粒子解聚而恢复荧光.

此外, 由于蛋白激酶的底物多肽特征序列类型十分丰富, 前述的某些识别原理在应用于不同激酶时会受到一定的局限, 如基于电荷变化或者金属离子/金属氧化物的磷酸化识别原理更适用于底物为正电荷多肽的蛋白激酶, 而用于底物多肽为富含羧基(负电荷)的蛋白激酶时则会显著降低特异性, 因此需要发展一种更具普适性的识别机理. 基于此, 一些课题组利用丝/酪氨酸磷酸化可以有效抑制蛋白酶(氨肽酶)的水解活性这一生物学特性, 通过磷酸化前后多肽水解速率的不同成功实现蛋白激酶活性的荧光检测^[32]. 最近, 聂舟课题组^[33,34]发展了磷酸化保护抑制另一种蛋白酶——羧肽酶(CPY)酶切的激酶识别机制, 可有效检测具有不同底物类型的多种蛋白激酶.

3.2 基于 ATP 分子修饰的激酶活性检测

由于蛋白质磷酸化过程中伴随着 ATP 的参与,

并将 ATP 上的 γ 位磷酸基团通过激酶催化转移至底物多肽的磷酸化位点, 因此将 ATP 上的 γ 位磷酸基进行生物素、巯基、二茂铁及荧光素等功能化修饰, 在磷酸化反应后这些功能基也就能随 ATP 的磷酸根转移至底物多肽上, 从而实现蛋白激酶的定量检测. 此方法极大地降低了蛋白质磷酸化检测的要求, 能直接方便地体现磷酸化反应结果, 但由于修饰 ATP 与 ATP 在分子结构上的差异, 可能对蛋白激酶活性产生一定影响.

Kraatz 课题组^[35-37]报道了一系列基于 ATP 标记用于检测蛋白激酶的策略, 并将其发展成为一种普适性方法实现多种激酶的灵敏检测. 例如, 通过合成二茂铁修饰的 ATP, 将电化学活性的二茂铁通过蛋白激酶的磷酸化反应, 转移到底物多肽的磷酸化位点, 用电化学循环伏安法(CV)检测二茂铁的氧化还原电流信号, 从而直接方便地用于检测多肽的磷酸化.

3.3 基于类适配体多肽的活性激酶直接识别

前述蛋白激酶的识别及检测原理均基于对磷酸化过程及其产物的鉴定, 适用于绝大多数激酶检测的情况, 但由于基于此类原理的检测方法均需要较长的磷酸化反应过程, 且大部分方法还涉及后续的样品清洗、信号产生与放大等繁琐步骤, 在一些需要对活性蛋白激酶进行快速连续检测的条件下应用会受到局限, 如细胞内蛋白激酶激活过程的连续检测. 因此, 开发蛋白激酶的一步法快速检测技术, 对于激酶的时序激活研究具有很重要的意义. 鉴于此, 研究者从生物体内调节激酶功能的内生性多肽出发, 发展了一种新的蛋白激酶识别多肽, 这类多肽由于其识别作用类似于核酸适配体, 因此被命名为类适配体多肽.

类适配体多肽的首个例子来源于蛋白激酶 PKA 的天然抑制蛋白, 即蛋白激酶抑制剂(PKI, protein kinase inhibitor)^[38]. PKI 含有一个类似于底物多肽识别域(RRXS)的 RRNAL 片段, 其中丙氨酸替换了底物多肽中间的磷酸化位点丝氨酸^[39]. 从抑制蛋白 PKI 上衍生而来的一条含有 20 个氨基酸残基的多肽(IP₂₀), 对 PKA 催化亚基表现出了高亲和力与特异性, 已报道 IP₂₀对 PKA 具有很强的抑制能力, 抑制常数 $K_i=0.3$ nmol/L, 而底物多肽 kemptide 与 PKA 之间的结合常数仅为 5 μ mol/L^[40,41]. 另一类激酶类适配体多肽衍生于糖原合成酶激酶-3 (GSK-3)的底物, 其基底含有特

异识别单元 S¹XXXS²(p), 将第一个丝氨酸(S¹)用丙氨酸(A)取代后, 可以衍生出一系列高效选择性的基底竞争性抑制剂. 由于这些源自蛋白激酶抑制蛋白的类适配体多肽能够与活性激酶进行特异性结合, 并且有大量的蛋白激酶有其对应的抑制蛋白及多肽, 因此是发展新型蛋白激酶识别单元的潜在宝库^[39,40].

正是基于上述原理, 我们利用类适配体多肽对于活性激酶的高亲和力和特异性, 发展了一种一步快速实时检测蛋白激酶的压电石英晶体微天平(QCM)传感器^[42]. 在传感器中, IP₂₀多肽通过 His-tag/Ni²⁺-NTA 生物亲和作用修饰于 QCM 电极上, 由于 IP₂₀对于 PKA 的特异性识别作用, 通过压电频率变化实时反映结合的 PKA 含量, 应用此方法可达到 0.061 mU/ μ L 的检测限. 该检测无需磷酸化反应过程, 可在 10 min 内完成检测, 对于实现动态监测胞内激酶具有重要意义.

4 基于功能纳米材料的蛋白激酶传感方法

在蛋白激酶纳米传感器设计中, 利用上述原理可以实现蛋白激酶及其磷酸化产物的特异性分子识别, 而功能纳米材料则会在生物传感过程中的后续关键步骤, 如识别行为的信号产生及转化、传感界面构建以及生化信号放大中发挥重要作用. 纳米材料微观上所具备的独特纳米效应(表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应和宏观隧道效应等), 决定了其宏观上表现出优异的光学、电学、磁学等特性; 并且纳米材料由于尺寸小、比表面积大、表面原子价态不饱和和性高, 相应产生大量活性中心, 表面活性极强, 因此具有优异的催化性质. 合理利用这些独特性质及这些性质之间的协同作用, 可以为激酶分析传感提供高灵敏的信号探针及信号产生的催化剂, 并可用于发展新的高效信号转换原理. 随着纳米技术的不断发展, 纳米材料的组分、形貌、尺寸能够通过合成方法和条件的优化得到精确控制, 并且纳米材料表面修饰及功能化的手段也不断得到完善, 因此可以利用纳米材料的高比表面积及生物相容性实现纳米材料上高负载多种配体、生物大分子和酶, 构建新的信号放大平台用于高灵敏生物分析, 显著降低检测限^[8,9]. 此外, 纳米材料由于纳米级尺寸有利于传感装置的微型化, 能够减少所需样品的体积和缩短反应时间, 为集成化、高通量检测提供基础. 因此, 将

功能化纳米材料和激酶特异性识别原理有机结合起来, 为开发新型的激酶活性检测和蛋白磷酸化分析方法提供了广阔的应用前景.

鉴于此, 为了进一步提高激酶检测的分析效能, 越来越多的基于纳米材料的激酶传感器不断被构建与完善, 并在激酶生物分析中发挥着日益重要的作用. 下面主要依据不同的分析技术对纳米材料在激酶传感中的应用进行总结.

4.1 比色法

比色检测法由于操作简单、结果肉眼可视、分析速度快、仪器需求低且价格低廉的优点, 被广泛应用于蛋白激酶检测. 金纳米颗粒(AuNPs)、金纳米棒(AuNRs)、银纳米颗粒(AgNPs)等纳米材料由于独特的表面等离子体共振现象, 是比色分析中最有潜力和前景的材料. 一定条件下的纳米颗粒聚集将会引起颗粒间共振耦合的改变, 从而引起宏观上明显的颜色变化, 为我们探测特定目标物提供了一种可靠的检测平台. 在激酶的检测中, 通过巧妙设计, 利用磷酸化调节纳米颗粒聚集和分散状态来构建比色传感平台. 根据聚集原理可将纳米比色检测方法分为以下两类(图 2):

(1) 通过修饰不同基团的纳米颗粒间的交叉偶联, 如生物素-亲和素作用、抗原-抗体识别、SH2 等

结构域或特定金属离子识别磷酸化修饰位点, 引起修饰后纳米颗粒的有效聚集而显色. 例如, Brust 课题组^[43]以生物素修饰的 ATP 为原料, 在激酶的催化下, AuNPs 表面的底物肽链发生磷酸化并被生物素标记, 进而与链霉亲和素功能化的 AuNPs 发生颗粒间的交叉偶联而聚集显色(图 2(a)). 该方法为激酶检测提供了新思路, 但仍存在过程相对复杂、耗时长等不足. 在此基础上, Stevens 课题组^[44]将抗体应用于酪氨酸激酶的一步法测定, 磷酸化后, 底物多肽修饰的 AuNPs 与抗体修饰的 AuNPs 发生交联聚集而显色, 实现激酶的高特异、高灵敏检测. 通过进一步改进, 他们把传感体系简化成仅有一种修饰金纳米颗粒, 利用抗体的双识别位点进行交联, 介导磷酸化底物修饰的 AuNPs 发生聚集, 同样实现了激酶检测(图 2(b))^[45]; Bhatia 课题组^[46]则使用特异性蛋白结构域用于识别, 在聚合物包裹的超磁性纳米材料表面分别修饰 Ab1 酪氨酸激酶底物序列和 SH2 结构域, 激酶和碱性磷酸酶催化介导两种颗粒间的聚集和分散, 并有效引起磁共振成像的改变, 可以用于两种酶的相对定量检测, 并有望发展基于 AuNPs 和 SH2 结构域识别激酶的比色新方法.

(2) 通过调控纳米颗粒表面电荷或者加入高离子强度的盐溶液, 破坏起稳定纳米颗粒作用的表面

图 2 基于功能纳米材料的激酶比色分析方法. (a) 生物素-亲和素作用引起的 AuNPs 交联聚集用于激酶检测^[43]; (b) 抗体介导的磷酸化多肽功能化 AuNPs 交联聚集用于激酶检测^[45]; (c) 多肽吸附诱导 AuNPs 非交联聚集用于激酶活性检测^[47,48]; (d) 基于 CPY 裂解和未修饰 AuNPs 的 PKA 活性比色测定^[34]

双电层, 从而发生聚集. 这类方法的优点是无需对纳米颗粒进行特殊表面标记, 且响应速度迅速.

Katayama 课题组基于磷酸化前后的底物多肽序列的变化来调节金纳米颗粒表面静电荷, 建立了一种简单、迅速的检测细胞裂解液中蛋白激酶 PKA^[47] 和 c-Src 激酶^[48] 的传感方法(图 2(c)). 在该传感设计中, 通过柠檬酸还原法制备的 AuNPs 表面带负电, 正电荷底物多肽通过半胱氨酸巯基结合在 AuNPs 上从而降低表面电荷, 引起 AuNPs 的聚沉而显蓝色; 相反, 经过磷酸化修饰的多肽正电荷显著减少, 不能有效引起 AuNPs 聚集, 因此 AuNPs 溶液呈酒红色. 更进一步, 他们借助 AuNRs 对局部微环境变化的高灵敏性, 利用类似原理通过磷酸化介导 AuNRs 发生聚集, 引起近红外区域的吸收明显减小, 从而用于多种蛋白激酶的检测及相应抑制剂的评价^[49]. 本课题组^[34]将磷酸化保护机制与金纳米颗粒非交联聚集相结合, 利用磷酸化修饰对于 CPY 的水解抑制作用, 设计了一种免标记的 AuNPs/多肽平台用于激酶检测, 经过磷酸化修饰的正电荷多肽不会被共存的 CPY 剪切成碎片, 从而引起 AuNPs 的偶联聚集(图 2(d)). 汪尔康课题组^[50]则从 ATP 对 AgNPs 的特殊保护作用出发, 设计了基于比色的酶传感体系, 激酶催化的底物磷酸化伴随着 ATP 向 ADP 的转化, 由于 ADP 相比于

ATP 含有更少的磷酸基团和负电荷而失去对 AgNPs 的保护作用, 继而发生聚集, 通过颜色变化输出信号.

4.2 荧光法

荧光分析方法具有灵敏度高、分析速度快、操作简便灵活、易于实现自动化和高通量分析以及极高的时间和空间分辨率等优势, 目前已在生物化学研究中得到了广泛的应用, 并被成功用于活体实时、原位和无损分析. 在激酶的检测中, 很多商业化的试剂盒均基于荧光方法. 相应地, 荧光纳米传感器也是纳米材料在激酶分析中的主要应用. 在荧光激酶分析中, 纳米材料主要起到以下几种作用: 作为荧光标记用于非均相界面检测、作为荧光供体用于荧光共振能量转移(FRET)、作为纳米猝灭剂用于荧光猝灭、又或通过纳米材料聚集引发自身荧光猝灭(图 3).

4.2.1 非均相检测

基于非均相的激酶荧光检测方法屡见报道. 例如, 联合 Ti^{4+} 对磷酸基团的特异识别作用和纳米材料的小尺度, Tao 课题组^[51]开发了一种同时检测磷酸化水平和蛋白质表达水平的多功能检测平台, 可溶的纳米聚合物 pIMAGO 表面同时被 Ti^{4+} 和近红外荧光

图 3 基于功能纳米材料的激酶荧光分析方法. (a) 基于功能化的 pIMAGO 用于磷酸化水平及蛋白表达水平同时检测^[51]; (b) 基于 UCNPs 的共振能量转移用于激酶活性分析^[60]; (c) 基于石墨烯/多肽的纳米复合物及磷酸化保护机理的蛋白激酶活性分析^[33]; (d) 基于 CdTe 量子点聚集的激酶分析方法^[63]

报告分子修饰, 可与固定在酶标板上的磷酸化底物蛋白进行特异性结合, 用于鉴定磷酸化水平; 再用荧光修饰抗体识别底物蛋白反映蛋白浓度, 两者信号相互比较可以较好反映蛋白的磷酸化程度(图 3(a)). 该方法适用于高通量检测, 且不易被组织样品中的吸收、散射光或自发荧光干扰^[51]. 李正平课题组^[52]发展了一种双参数读出的激酶荧光检测法, 利用 TiO_2 包裹的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ 微球选择性富集磷酸化后的荧光标记多肽, 直接用于荧光成像或者检测解吸附释放后的荧光强度, 间接反映出激酶活性的大小, 该传感思路可成功用于细胞裂解液中 PKA 及 Akt1 的监测. 类似地, 他们利用 Zr^{4+} 功能化的介孔 SiO_2 微球选择性吸附磷酸化多肽, 最后借助流式细胞仪分选, 从而实现超高灵敏度的激酶检测与抑制剂筛选, 检测限低至 $0.006 \text{ mU}/\mu\text{L}$ ^[53].

4.2.2 基于共振能量转移(FRET 或 LRET)原理的检测

Tsien 等^[22,23]最早基于 FRET 原理设计了一种新的融合蛋白作为探针, 这个探针的两端分别是 GFP 的衍生物 CFP 与 YFP, 中间是包含磷酸化底物序列和磷酸化识别结构域的连接片段. 激酶催化底物磷酸化后, 特定结构域与磷酸化底物紧密结合, 进而引发分子内部折叠, CFP 与 YFP 相互靠近而发生能量迁移. 这种方法是第一种细胞内实时分析激酶活性的方法, 可以很好地观察活细胞内酶活性变化及空间分布, 是一种非常有效的研究手段.

由于量子点具有激发光谱宽、发射光谱窄且对称、发射波长可调、荧光强度高和光稳定性好等独特的光学性质, 以量子点作为 FRET 供体的蛋白激酶检测方法也陆续出现. Willner 课题组^[54]用荧光素 ATTO-590 标记 ATP, 通过磷酸化反应修饰在量子点表面的多肽上, 从而拉近量子点与荧光染料的空间距离产生 FRET 现象, 实现 CKII 的特异检测; 它们继续用该荧光素修饰磷酸化丝氨酸抗体, 经过 CKII 的反应后再用抗体识别, 同样可以拉近量子点和荧光素的距离, 引起量子点特异的荧光减弱而染料特异的荧光大大增强, 用于 CKII 的检测. 类似地, Stevens 等^[55,56]也基于标记在抗体上的荧光染料(Alexa Fluor 647)与量子点的 FRET 同时实现了蛋白酶和激酶的检测. Katayama 课题组^[57]则设计了基于磷酸化前后电荷变化的免抗体标记激酶传感方法, 他们使用

TAMRA 标记正电荷底物多肽, 并与表面带负电荷的无需任何修饰的量子点(QD)发生静电吸附, 引发从 QD 到 TAMRA 的 FRET 过程, 而磷酸化反应中和了多肽的正电荷, 阻碍了在量子点上的吸附而维持其原有荧光.

此外, 荧光共轭聚合物(CPs)具有较强的光捕获能力, 可有效放大荧光传感信号, 在疾病诊断以及生物检测等方面发挥越来越重要的作用, 因此它们也是 FRET 中一种常用的供体分子. Hancock 等^[58]利用阴离子 CPs 与罗丹明标记的磷酸化多肽之间的 FRET 构建了灵敏的激酶检测平台, 该设计首先将 Ga^{3+} 复合到 CPs 的表面, 再经过与罗丹明修饰的多肽孵育, 最后通过 455 nm 处 CPs 自身荧光与 585 nm 处罗丹明荧光的强度比例来表征酶活力. 李正平课题组^[59]合成了侧链含有两个羧乙基的阴离子聚合物 PFPaa, 与 Zr^{4+} 耦合后再识别荧光素标记的磷酸化多肽, 从而引发聚合物与荧光染料间的能量传递, 在激酶存在下, 采用 370 nm 激发光, 聚合物特异的 424 nm 处荧光大大减小而 FITC 在 520 nm 处的荧光显著增强.

然而, 上述基于 QD 或荧光共轭聚合物的方法, 由于发射波长短, 在应用于生物样品时难免受组织自发荧光干扰. 近来, 李正平课题组^[60]发展了一种基于上转换纳米磷光颗粒 UCNPs 的激酶传感新方法(图 3(b)). 该方法充分利用近红外波段激发的上转换纳米磷光颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ 能够同时吸收两个或多个近红外(NIR)光子的特性, 将其作为有效的能量供体和磷酸化多肽识别单元, 从而引起高效的共振能量转移(LRET), 实现了蛋白激酶的灵敏、快速检测, 而无需对纳米材料进行特定修饰、固定与分离.

4.2.3 基于荧光猝灭原理的检测

有机聚合物、氧化石墨烯(GO)及贵金属纳米颗粒等纳米材料的高效猝灭性质被广泛用于荧光传感器设计中. 例如, Whitten 课题组^[61]将荧光共轭聚合物和 Ga^{3+} 沉积到微球表面, 激酶催化磷酸化反应后, 罗丹明修饰的多肽被吸附到微球表面, 有效猝灭聚合物的荧光, 且荧光强度与激酶活性呈负相关. 他们进一步开发了一种荧光 turn-on 策略用于激酶检测, 该设计用染料标记的磷酸化多肽作为信号多肽, 目标底物多肽经激酶催化磷酸化后, 被吸附到 Ga^{3+} 包裹的荧光聚合物微球表面, 将有效阻止信号多肽的吸附, 从而抑制其猝灭效应并保持较强的荧光, 而未

磷酸化的底物多肽无此效果^[61]. 这种方法具有普适性, 通过改变底物序列可用于其他激酶的检测.

从 GO 的超高猝灭效率出发, 本课题组^[33]利用磷酸化保护抑制多肽酶解效应作为通用识别机理, 提出了一种多功能的新型荧光多肽/石墨烯传感体系用于 CKII 和 PKA 的检测(图 3(c)). FITC 修饰的多肽序列在磷酸化后可有效阻碍 CPY 的消化剪切, 维持其长链结构而被吸附到 GO 的表面, 继而引发荧光猝灭; 当体系存在抑制剂时, 多肽被 CPY 完全水解释放出游离的 FITC 分子, 体系荧光显著增加. 该方法对 CKII 和 PKA 的检测限分别达到 0.0833 和 0.134 mU/ μ L 的. 该传感器具有普适性, 并可用于荧光、荧光各向异性、多激酶同时检测等多模式分析. 此外, 进一步依据类适配体多肽 IP₂₀ 对 PKA 的高亲和力, 我们利用 FITC 修饰 IP₂₀ 吸附到 GO 表面猝灭荧光, 构成 IP₂₀/GO 多肽纳米复合物, 当 PKA 存在时与 IP₂₀ 特异性结合, 并将其从 GO 表面解吸附而恢复荧光, 此方法实现了对活性激酶的快速(少于 10 min)荧光检测^[62].

此外, 纳米材料自身的特殊自猝灭现象可用于发展新型蛋白激酶荧光传感器. 本课题组^[63]构建了一种基于碲化镉(CdTe)量子点聚集诱导自猝灭现象的荧光检测方法(图 3(d)). 正电荷底物多肽导致表面富含负电荷的 CdTe 量子点发生选择性聚集, 量子点荧光显著猝灭并伴随着发射红移. 激酶催化磷酸化过程中和底物多肽正电荷, 从而抑制量子点聚集并保持强荧光信号. 基于荧光强度及其颜色的显著变化, 该方法成功用于检测 Forskolin/IBMX 激活的细胞裂解液中的 PKA. 与一般方法相比, 该方法操作简单且无需多肽标记或对量子点修饰, 并且实现了激酶活性的均相可视化检测. 邱建丁课题组^[64]则利用 Zr⁴⁺交联多个磷酸化位点, 引发磷酸化多肽修饰石墨烯量子点(GQDs)的聚集, 利用 GQDs 的聚集诱导猝灭现象检测 CKII 的活性.

此外, 贵金属纳米材料的特殊猝灭现象也被引入到激酶检测中. 蒋健晖课题组^[65]以多肽为模板合成金纳米簇(AuNCs), 其中多肽紧密包覆在 AuNCs 表面并保留其底物活性, PKA 或去乙酰化酶(HDAC)催化的修饰反应后, AuNCs 表面多肽层变得疏松, 体系中溶解的氧扩散到 Au 核表面并氧化 Au 原子, 从而猝灭 AuNCs 荧光, 实现基于 AuNCs 的通用型翻译后修饰酶检测. 邱建丁课题组^[66]利用多肽作为模板

和还原剂合成荧光 AuNCs, 同时该多肽含有 CK2 的识别位点, 磷酸化后通过 Zr⁴⁺介导引起 AuNCs 聚集而发生荧光猝灭, 从而发展了均相、免标记的通用型激酶检测方法, 并实现了多种抑制剂的筛选. 此外, 基于类似方法, 他们利用含有 PKA 识别位点的多肽合成 AuNCs, 激酶催化的磷酸化反应阻碍了 CPY 对多肽底物的切割, AuNCs 维持较强的荧光. 相反, 未经底物磷酸化的 AuNCs 被 CPY 有效剪切而破坏其保护层多肽, 引起荧光猝灭, 依据此原理实现了 PKA 的特异检测^[67]. 王建秀课题组^[68]以聚胞嘧啶寡核苷酸(dC12)为模板合成银纳米簇(AgNCs), 当与 ATP 共存时, AgNCs 的荧光可以得到有效增强, 而当 PKA 存在时, ATP 会被 PKA 结合, AgNCs 的荧光相对减弱, 从而实现 PKA 的灵敏、选择性检测. Prins 课题组^[69]利用 AuNPs 对荧光探针的有效猝灭, 而 ATP 与 ADP 对该荧光探针的竞争大小迥异, 磷酸化产物 ADP 失去了对荧光探针的有效置换, 从而实现了免标记的普适性激酶传感.

4.3 电化学法

电化学方法由于灵敏度高、操作方便且仪器设备简单, 在激酶传感器设计中已经有较多的应用. 纳米材料的高比表面积、优异的电导及催化性能, 使其能够有效提高电化学传感器的分析效能. 目前, 纳米材料在电化学激酶传感中的应用主要可分为以下三类(图 4): 纳米材料直接作为电化学活性探针; 引入碳纳米管(CNT)、AuNPs 等材料进行电化学信号放大; 作为催化剂或电化学发光试剂载体用于电化学发光(ECL)检测.

4.3.1 纳米材料直接充当电化学活性探针

Tamiya 等^[70]将 AuNPs 独特的电化学活性用于激酶传感器构建中, biotin 修饰 ATP 通过磷酸化修饰在多肽功能化金电极表面, 再将电极浸于亲和素修饰的 AuNPs 溶液中孵育, 从而将 AuNPs 组装到电极表面, 再在 0.1 mol/L HCl 中进行电化学氧化扫描. 通过微分脉冲伏安法(DPV)还原 AuCl₄⁻, 达到检测激酶活性的目的. Kraatz 课题组^[36]用 5'-[γ -硫代]三磷酸腺苷(ATP-S)作为共反应物, 磷酸化反应后, 在多肽的磷酸化位点接入一个硫取代的磷酸基, 该硫取代基团可捕获金纳米颗粒, 最后通过方波伏安法(SWV)检测还原电流信号, 从而定量检测激酶活性(图 4(b)).

电化学分析

图 4 基于功能纳米材料的激酶电化学分析方法. (a) 基于 Zr^{4+} 和 DNA-AuNPs 的电化学方法检测激酶活性^[78]; (b) 基于 ATP-S 和 AuNPs 的电化学方法检测激酶^[36]; (c) 利用 AuNPs 作为催化探针的激酶 ECL 检测^[80]

刘宝红课题组^[71]使用 TiO_2 辅助的银放大技术成功检测了蛋白激酶 PKA 的活性. 在金电极上固定底物多肽 kemptide, PKA 催化下发生磷酸化后, TiO_2 纳米颗粒特异性结合在磷酸化位点, 由于 TiO_2 独特的光催化特性, 紫外(365 nm)照射下, 其表面会发生 Ag^+ 的光催化还原, 生成的 AgNPs 沉积在 TiO_2 表面, 再用 DPV 法检测银纳米粒子的氧化峰电流, 由此实现 PKA 活性的灵敏检测, 检测限低至 0.2 mU/ μL .

4.3.2 纳米材料用于电化学信号放大

CNT 作为一维纳米材料, 具备许多优越的电学及化学性能, 使用 CNT 修饰电极能大大加速电极表面的电子转导过程. 早在 20 世纪 80 年代, Brabec 等^[72]就报道了酪氨酸能在碳电极上被氧化, 该过程涉及两个电子和两个质子的转移, 类似于苯酚在电极表面的氧化过程. 近年来, 进一步研究发现, 酪氨酸磷酸化后, 其电流响应相应减弱, 氧化电势要求更高^[73]. 基于此, 郭良宏课题组^[74]通过电子媒介体催化酪氨酸氧化, 实现了对蛋白质磷酸化反应和蛋白激酶活性的无标记检测. Kerman 等^[75]利用 CNT 修饰电极的高灵敏性及酪氨酸自身在电极表面的氧化电流信号响应, 开发了一类全新的用于研究多肽磷酸化的方法. 酪氨酸激酶 PTKs 的多肽底物 Raytide 通过羧基与磁珠表面的氨基交联, 磁珠进一步将反应后的多肽富集在多壁碳纳米管(MWCNT)修饰的电极表面, 通过 DPV 法检测酪氨酸的氧化电流信号, 实

现无标记检测酪氨酸激酶的活性以及抑制剂的抑制行为, 但此方法只限于酪氨酸蛋白激酶的监测, 对于其他种类激酶则不适用. 王柯敏课题组^[76]将 TiO_2 /MWCNT 纳米复合物修饰在金电极表面, CKII 催化磷酸化反应后, 通过 TiO_2 对于磷酸基团的特异性结合将多肽固定在电极表面, 从而阻碍了 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 的电子传递过程, 最终通过循环伏安图中峰电流的减小对激酶活性进行定量.

AuNPs 具有大的比表面积, 可以用来装载多种生物分子或者探针, 常被用来放大激酶检测的电化学信号. 李根喜课题组^[77]用生物素标记的磷酸化抗体识别修饰在金电极表面的多肽底物, 再加入同时用链霉亲和素(SA)和辣根过氧化物酶(HRP)修饰的 AuNPs, 通过亲和素-生物素的特异结合将 HRP 固定到电极表面, 催化 H_2O_2 分解和 TMB 的氧化, 从而产生可用于检测的信号. 本课题组^[78]基于 Zr^{4+} 对磷酸基团的识别作用将表面修饰大量 DNA 链的 AuNPs(DNA-AuNPs)偶联到磷酸化多肽修饰的金电极表面, 进而通过静电吸附作用将大量电活性物质 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 装载到 DNA 的磷酸骨架上, 构建了一种基于金属离子识别的无标记电化学传感器, 用于检测蛋白激酶的活性(图 4(a)). 该传感器具有高灵敏、线性范围宽等优点, 且无需标记及磷酸化识别蛋白, 并将丰富的 DNA 传感及信号放大方法引入到激酶传感中. 基于类似原理, 李景虹课题组^[79]在金电极表面修饰 PKA 的底物多肽, 其磷酸化之后经过 Zr^{4+} 特

异识别, 并与 DNA-AuNPs 的杂交聚集体进行偶联, 多个 DNA-AuNPs 的交联网状结构吸附大量的电活性物质 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, 实现信号的有效放大和激酶的灵敏监测, 检测限低至 0.03 U/mL, 线性范围为 0.03~40 U/mL, 并成功用于 BE4S-2B、A549 和 MCF-7 等细胞的裂解液及血清等复杂样品中的激酶分析。

4.3.3 电化学发光(ECL)检测

电化学发光是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应, 是电化学和化学发光两个过程的有机结合。正是由于整合了这两方面的双重优势, 电化学发光分析法具有灵敏度高、动态响应范围宽、仪器设备简单、操作方便、易于实现自动化等特点, 广泛地应用于生物、药学、医学、环境等多个领域, 也逐步被引入到激酶传感设计中。李景虹课题组^[80]使用 ATP-S 通过磷酸化修饰在电极表面的多肽上, 再通过 S-Au 键连接 AuNPs 粒子, 利用 AuNPs 催化放大鲁米诺的电发光信号实现激酶检测(图 4(c))。这是第一个基于 ECL 的激酶传感实例, 其中 AuNPs 作为灵敏的信号催化探针, 灵敏度高、稳定性好。邢达课题组^[81]基于磁珠技术和 AuNPs 的信号放大作用设计了简单的 ECL 激酶检测方法。用生物素修饰的多肽进行磷酸化反应后, 俘获到链霉亲和素(SA)包裹的磁珠表面, 再通过 Zr^{4+} 与 ECL 纳米探针交联, 开发一种简单可逆的激酶及其抑制剂检测体系。王珂敏课题组^[82]则采用 Zr^{4+} 介导磷酸基团修饰钌包裹

SiO_2 纳米粒子(R-PSiNPs)与磷酸化多肽发生交联, 将 R-PSiNPs 结合到电极表面, 有效放大 ECL 信号, 实现激酶的高灵敏、高特异检测。邱建丁课题组^[83]预先制备生物素修饰 DNA 和葡萄糖氧化酶(GOx)双修饰 AuNPs, 当体系存在 PKA 时, 装配在金电极表面的底物多肽被磷酸化, 进而与生物素修饰抗磷酸化丝氨酸抗体特异结合, 最后加入亲和素和上述多修饰的 AuNPs, 进一步引起交联放大, 从而催化葡萄糖的氧化并伴随着鲁米诺的 ECL 过程, 该传感灵敏度高、稳定性好。进一步简化步骤, 刘洋课题组^[84]在金电极表面修饰 PKA 底物序列, 磷酸化后经过 Zr^{4+} 交联, 与黄嘌呤氧化酶(XOD)及 DNA 双修饰 AuNPs 进一步偶联放大, 有效催化溶解氧产生 H_2O_2 , 同时伴随着鲁米诺的 ECL 信号产生。

4.4 其他检测方法

共振光散射(RLS)及表面增强拉曼光谱(SERS)在蛋白激酶分析中的应用日趋广泛(图 5)。RLS 是分子光谱领域的一种新兴技术, 具有灵敏度高、检测快速、仪器简单等优势, 在生命科学、环境科学以及纳米材料分析测试等方面显示出较好的优越性。而 SERS 是一种超灵敏的振动光谱技术, 可用于检测等离子纳米材料表面附近的分子。SERS 是检测痕量物质甚至是单分子的一种有效方法, 鉴于拉曼信号半峰宽窄(约 1 nm)且可用的探针分子多、光谱重叠小, 此技术具有选择性好和灵敏度高的优点, 目前已广

图 5 基于功能纳米材料的激酶 RLS (a)^[87]及 SERS (b)^[89]分析方法

泛用于生物化学和生命科学的相关研究中。

王振新课题组^[85]充分利用微阵列技术的高通量筛选能力和 RLS 单分子水平的检测优势, 发展了一系列激酶分析新方法. 他们首先在阵列微孔板底修饰上无标记的多肽序列, 以 biotin-ATP 作为共反应物, 经激酶催化磷酸化, 再与 avidin 修饰的 AuNPs 作用, 最后通过银染, 增大纳米粒子粒径, 放大共振光散射信号, 成功实现了 1 fg 的激酶检测限, 且制作成蛋白磷酸化分析阵列, 对 H89、HA1077、KN62 和 mallotoxin 等激酶抑制剂进行快速高通量的筛选. 这种基于微阵列的检测模式信号读出快、消耗试剂少、经济成本低. 为了进一步提高此方法的灵敏性和准确性, 他们基于生物素-亲和素识别和抗磷酸化抗体识别设计了一种基于荧光和 RLS 的双读出阵列检测, 成功用于激酶抑制剂^[86]的筛选, 并继续发展用于细胞裂解液中 PKA 的检测(图 5(a))^[87]. 此外, 他们用生物素化的抗磷酸化丝氨酸抗体识别固定在酶标板底的多肽磷酸化位点, 再结合亲和素修饰 AuNPs 和银染放大, 大大增强 SERS 信号, 实现激酶^[88]及抑制剂(图 5(b))^[89]的高灵敏检测.

表面等离子体共振(SPR)是另一种可被用来实时跟踪生物分子间相互作用的光谱分析技术. 这种方法对生物分子无任何损伤, 且不需任何标记物. 近来, 王伟课题组^[90]利用表面等离子共振成像技术实时监测蛋白激酶磷酸化过程的动力学. 通过 PEG 将激酶底物多肽功能化金纳米颗粒(AuNPs)固定到金电极表面, 从而自组装形成纳米振荡器, 此振荡器的振荡频率与 AuNPs 的带电荷量直接相关. 磷酸化引起 AuNPs 表面负电荷积聚, 在电场的作用下纳米颗粒的振荡频率及振幅发生明显改变, 从而可以用表面等离子体共振成像来观察 AuNPs 远离界面的情况, 实现磷酸化过程的动态监测. 该方法无需使用抗体, 并且可以实时跟踪激酶反应的动力学过程并获得相关酶促反应动力学常数, 是一种拥有广阔前景的酶分析技术.

此外, 质谱(MS)是蛋白质组学研究中进行磷酸化鉴定的重要技术, 其在激酶活性分析中也有少量应用. 基于 MS 的磷酸化检测操作简单、无需标记与复杂的分离步骤, 而且易于实现高通量筛选或者多目标同时分析. Kim 课题组^[91]将底物多肽功能化的 AuNPs 应用于二次离子质谱成像技术, 发展了一种免标记的 Ab1 激酶分析方法. 其中, AuNPs 不仅可以

增强检测信号而且被用于富集检测目标, 并通过二次离子质谱图中的初始非磷酸化多肽与磷酸化多肽的信号比来反映蛋白激酶催化效率.

5 总结与展望

多种新兴纳米材料及纳米技术的引入对促进蛋白激酶活性分析方法的发展发挥了巨大作用. 通过将蛋白激酶特异性识别原理与基于纳米材料的信号转换及放大方法合理结合, 发展了一系列激酶分析新原理及新方法, 极大地提高了激酶传感的分析效能. 但同时也可看到, 这些方法仍然有各自的局限, 复杂生物体系, 如活细胞或者组织样品, 以及以激酶为靶标的大规模药物筛选都对分析系统的准确性、灵敏性、选择性、快速和自动化以及重现性等方面提出了极高的要求, 发展满足这些要求的新型分析方法仍然是一项巨大挑战, 也预示着要想全面地解释和阐明磷酸化这一重要蛋白质修饰的调控功能, 任务仍然非常艰巨. 纳米激酶传感器目前所遇到的挑战以及未来可能的发展方向包括以下 6 个方面: (1) 目前的大多数激酶检测手段很多是基于不连续的终点检测, 无法实现激酶催化磷酸化反应的动力学监测, 不能对激酶动力学参数进行直接研究, 也无法监测激酶活性的实时变化过程, 因此发展连续的激酶活性检测方法会是未来激酶纳米传感技术发展的基本目标之一; (2) 与基因编码、内生表达的荧光蛋白传感器不同, 基于纳米材料的激酶传感器只有在实现纳米粒子的有效内化后, 才有望实现活细胞检测, 从这一角度讲, 通过合理的表面修饰及功能化策略有效提高纳米探针的膜穿透和内化能力, 对于激酶的活细胞检测极为关键; (3) 目前的检测手段大多数仅适用于细胞裂解液的间接分析, 而细胞裂解液体系与活细胞体系存在着显著差异, 发展活细胞激酶分析方法对于细胞生物学研究, 尤其是理解激酶在复杂信号网络下的功能, 具有重要意义; 此外, 发展基于活细胞的激酶靶向性药物筛选方法相对于常规筛选方法更能够反映细胞内药物作用的真实状态, 更有利于直接预估药物的实际有效性, 因此如何实现活细胞内的蛋白激酶的灵敏特异检测仍将是一大研究热点和难点; (4) 在灵敏度方面, 目前的检测手段难以实现单细胞水平的激酶活性检测, 结合新纳米材料及新纳米放大技术将有望实现具有单细胞检测

能力的超灵敏激酶探测体系; (5) 将一些具有特殊光学特性的新兴纳米材料用于激酶活性成像分析将会是另一主要趋势, 如通过合成近红外或者上转换纳米材料实现激酶的近红外检测, 从而大大提高检测探针的组织穿透性以及抗背景干扰能力, 并有望用于活体或组织成像; (6) 由于生命活动总是处在激酶网络的动态调节过程中, 这中间牵涉到多种激酶活性的协同变化, 因此如能实现多种激酶活性同时动态检测, 了解其时空分布及活性变化趋势, 将会成为人们从整体角度认识蛋白激酶功能的有力工具。

总之, 发展适用于活细胞内实时、连续、原位检

测的激酶分析新方法, 对于我们在时间及空间上理解激酶的时序激活过程及其调控机制具有重要意义; 而开发简单方便、低成本、高特异性、高通量的激酶活性分析方法将为以激酶抑制剂为代表的抗癌新药研发及大规模筛选提供条件。因此, 通过进一步合理设计激酶识别原理, 并与新型纳米材料优异性质有效整合, 发展新型纳米传感器, 并围绕以上几个方面进行深入探索, 将继续推动蛋白激酶功能及磷酸化修饰研究, 为我们全面认识生命体中复杂的激酶调控网络、深入解析其相关生理病理过程提供了可能。

致谢 本工作得到国家自然科学基金优秀青年科学基金(21222507)以及面上项目(21175036)资助, 特此一并致谢。

参考文献

- 1 Uy R, Wold F. Post-translational covalent modification of proteins. *Science*, 1977, 198: 890–896
- 2 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, 298: 1912–1934
- 3 Adams JA. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem Rev*, 2001, 101: 2271–2290
- 4 Johnson LN, Lewis RJ. Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev*, 2001, 101: 2209–2242
- 5 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002, 298: 1912–1934
- 6 Hastie CJ, McLauchlan HJ, Cohen P. Assay of protein kinases using radiolabeled atp: a protocol. *Nat Protoc*, 2006, 1: 968–971
- 7 Liu X, Li Y, Xu XH, Li P, Nie Z, Huang Y, Yao SZ. Nanomaterial-based tools for protein kinase bioanalysis. *TrAC Trends Anal Chem*, 2014, 58: 40–53
- 8 Rosi L, Mirkin CA. Nanostructures in biondiagnostics. *Chem Rev*, 2005, 105: 1547–1562
- 9 Saha K, Agasti SS, Kim C, Li XN, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem Rev*, 2012, 112: 2739–2779
- 10 Futreal PA, Kasprzyk A, Birney E, Mullikin JC, Wooster R, Stratton MR. Cancer and genomics. *Nature*, 2001, 409: 850–852
- 11 Sebolt-Leopold JS, English JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*, 2006, 441: 457–462
- 12 Cohen P. Protein kinases: the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 309–315
- 13 Petricoin EF, Liotta LA. Proteomic analysis at the bedside: early detection of cancer. *Trends Biotechnol*, 2002, 20: 30–34
- 14 Vieth M, Sutherland JJ, Robertson DH, Campbell RM. Kinomics: characterizing the therapeutically validated kinase space. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 839–846
- 15 Cohen P, Alessi DR. Kinase drug discovery—what's next in the field? *ACS Chem Biol*, 2012, 8: 96–104
- 16 de Jong FA, Verweij J. Role of imatinib mesylate (Gleevec/Glivec) in gastrointestinal stromal tumors. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2003, 3: 757–766
- 17 Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 493–502
- 18 Sebolt-Leopold JS, English JM. Mechanisms of drug inhibition of signalling molecules. *Nature*, 2006, 441: 457–462
- 19 Malvoisin E, Livrozet JM, El Hajji-Ridah I, Makloufi D, Vincent N. Detection of AMP-activated protein kinase in human sera by immunoelectric focusing. *J Immunol Methods*, 2009, 351: 24–29
- 20 Bradshaw JM, Waksman G. Molecular recognition by SH₂ domains. *Adv Protein Chem*, 2002, 61: 161–210
- 21 Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work?—Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett*, 2002, 513: 53–57
- 22 Ting AY, Kain KH, Klemke RL, Tsien RY. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 15003–15008
- 23 Zhang J, Ma YL, Taylor SS, Tsien RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 14997–15002
- 24 Wang Q, Lawrence DS. Phosphorylation-driven protein-protein interactions: a protein kinase sensing system. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 7684–7685

- 25 Sharma V, Agnes RS, Lawrence DS. Deep quench: an expanded dynamic range for protein kinase sensors. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 2742–2743
- 26 Grimsrud PA, Swaney DL, Wenger CD, Beauchene NA, Coon JJ. Phosphoproteomics for the masses. *ACS Chem Biol*, 2010, 5: 105–119
- 27 Leitner A. Phosphopeptide enrichment using metal oxide affinity chromatography. *TrAC Trends Anal Chem*, 2010, 29: 177–185
- 28 Wieckowska A, Li D, Gill R, Willner I. Following protein kinase activity by electrochemical means and contact angle measurements. *Chem Commun*, 2008: 2376–2378
- 29 Han A, Hosokawa K, Maeda M. Phosphate-affinity electrophoresis on a microchip for determination of protein kinase activity. *Electrophoresis*, 2009, 30: 3507–3513
- 30 Yin H, Sun B, Dong L, Li B, Zhou Y, Ai S. A signal “on” photoelectrochemical biosensor for assay of protein kinase activity and its inhibitor based on graphite-like carbon nitride, Phos-tag and alkaline phosphatase. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 462–468
- 31 Kim JH, Lee S, Park K, Nam HY, Jang SY, Youn I, Kim K, Park HJR, Kim IS, Choi K, Kwon IC. Protein-phosphorylation responsive polymeric nanoparticles for imaging protein kinase activities in single living cells. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 5779–5782
- 32 Kupcho K, Somberg R, Bulleit B, Goueli SA. A homogeneous, nonradioactive high-throughput fluorogenic protein kinase assay. *Anal Biochem*, 2003, 317: 210–217
- 33 Zhou J, Xu XH, Liu W, Liu X, Nie Z, Qing M, Nie LH, Yao SZ. Graphene oxide-peptide nanocomplex as a versatile fluorescence probe of protein kinase activity based on phosphorylation protection against carboxypeptidase digestion. *Anal Chem*, 2013, 85: 5746–5754
- 34 Zhou J, Xu XH, Liu X, Li H, Nie Z, Qing M, Huang Y, Yao SZ. A gold nanoparticles colorimetric assay for label-free detection of protein kinase activity based on phosphorylation protection against exopeptidase cleavage. *Biosens Bioelectron*, 2014, 53: 295–300
- 35 Song H, Kerman K, Kraatz HB. Electrochemical detection of kinase-catalyzed phosphorylation using ferrocene-conjugated ATP. *Chem Commun*, 2008: 502–504
- 36 Kerman K, Kraatz HB. Electrochemical detection of kinase-catalyzed thiophosphorylation using gold nanoparticles. *Chem Commun*, 2007: 5019–5021
- 37 Martić S, Labib M, Freeman D, Kraatz HB. Probing the role of the linker in ferrocene–ATP conjugates: monitoring protein kinase catalyzed phosphorylations electrochemically. *Chem-Eur J*, 2011, 17: 6744–6752
- 38 Dalton GD, Dewey WL. Protein kinase inhibitor peptide (PKI): a family of endogenous neuropeptides that modulate neuronal camp-dependent protein kinase function. *Neuropeptides*, 2006, 40: 23–34
- 39 Kaidanovich-Beilin O, Eldar-Finkelman H. Peptides targeting protein kinases: strategies and implications. *Physiology*, 2006, 21: 411–418
- 40 Eldar-Finkelman H, Eisenstein M. Peptide inhibitors targeting protein kinases. *Curr Pharm Des*, 2009, 15: 2463–2470
- 41 Cheng HC, Kemp BE, Pearson RB, Smith AJ, Misconi L, van Patten SM, Walsh DA. A potent synthetic peptide inhibitor of the camp-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 1986, 261: 989–992
- 42 Xu XH, Zhou J, Liu X, Nie Z, Qing M, Guo ML, Yao SZ. Aptameric peptide for one-step detection of protein kinase. *Anal Chem*, 2012, 84: 4746–4753
- 43 Wang ZX, Levy R, Fernig DG, Brust M. Kinase-catalyzed modification of gold nanoparticles: a new approach to colorimetric kinase activity screening. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2214–2215
- 44 Gupta S, Andresen H, Ghadiali JE, Stevens MM. Kinase-actuated immunoaggregation of peptide-conjugated gold nanoparticles. *Small*, 2010, 6: 1509–1513
- 45 Gupta S, Andresen H, Stevens MM. Single-step kinase inhibitor screening using a peptide-modified gold nanoparticle platform. *Chem Commun*, 2011, 47: 2249–2251
- 46 Maltzahn GV, Min DH, Zhang YX, Park JH, Harris TJ, Sailor M, Bhatia SN. Nanoparticle self-assembly directed by antagonistic kinase and phosphatase activities. *Adv Mater*, 2007, 19: 3579–3583
- 47 Oishi J, Asami Y, Mori T, Kang JH, Tanabe M, Niidome T, Katayama Y. Measurement of homogeneous kinase activity for cell lysates based on the aggregation of gold nanoparticles. *ChemBioChem*, 2007, 8: 875–879
- 48 Oishi J, Han XM, Kang JH, Asami Y, Mori T, Niidome T, Katayama Y. High-throughput colorimetric detection of tyrosine kinase inhibitors based on the aggregation of gold nanoparticles. *Anal Biochem*, 2008, 373: 161–163
- 49 Kitazaki H, Mori T, Kang JH, Niidome T, Murata M, Hashizume M, Katayama Y. A colorimetric assay of protein kinase activity based on peptide-induced coagulation of gold nanorods. *Colloids Surf B*, 2012, 99: 7–11
- 50 Wei H, Chen CG, Han BY, Wang EK. Enzyme colorimetric assay using unmodified silver nanoparticles. *Anal Chem*, 2008, 80: 7051–7055
- 51 Pan L, Iliuk A, Yu S, Geahlen RL, Tao WA. Multiplexed quantitation of protein expression and phosphorylation based on functionalized soluble nanopolymers. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18201–18204
- 52 Bai J, Zhao YJ, Wang ZB, Liu CH, Wang YC, Li ZP. Dual-readout fluorescent assay of protein kinase activity by use of TiO₂-coated magnetic microspheres. *Anal Chem*, 2013, 85: 4813–4821
- 53 Ren W, Liu CH, Lian S, Li ZP. Flow cytometry-assisted mix-and-read assay for ultrasensitive detection of protein kinase activity by use of Zr⁴⁺-functionalized mesoporous SiO₂ microspheres. *Anal Chem*, 2013, 85: 10956–10961
- 54 Freeman R, Finder T, Gill R, Willner I. Probing protein kinase (CK2) and alkaline phosphatase with CdSe/ZnS quantum dots. *Nano Lett*,

- 2010, 10: 2192–2196
- 55 Ghadiali JE, Cohen BE, Stevens MM. Protein kinase-actuated resonance energy transfer in quantum dot-peptide conjugates. *ACS Nano*, 2010, 4: 4915–4919
- 56 Lowe SB, Dick JG, Cohen BE, Stevens MM. Multiplex sensing of protease and kinase enzyme activity via orthogonal coupling of quantum dot-peptide conjugates. *ACS Nano*, 2012, 6: 851–857
- 57 Shiosaki S, Nobori T, Mori T, Toita R, Nakamura Y, Kim CW, Yamamoto T, Niidome T, Katayama Y. A protein kinase assay based on FRET between quantum and fluorescently-labeled peptides. *Chem Commun*, 2013, 49: 5592–5594
- 58 Moon JH, Maclean P, McDaniel W, Hancock LF. Conjugated polymer nanoparticles for biochemical protein kinase assay. *Chem Commun*, 2007, 46: 4910–4912
- 59 Bai J, Liu CH, Yang T, Wang FF, Li ZP. A versatile platform for highly sensitive detection of kinase activity based on metal ion-mediated FRET with an anionic conjugated polymer. *Chem Commun*, 2013, 49: 3887–3889
- 60 Liu CH, Chang LJ, Wang HH, Bai J, Ren W, Li ZP. Upconversion nanophosphor: an efficient phosphopeptides-recognizing matrix and luminescence resonance energy transfer donor for robust detection of protein kinase activity. *Anal Chem*, 2014, 86: 6095–6102
- 61 Rininsland F, Xia WS, Wittenburg S, Shi XB, Stankewicz C, Achyuthan K, McBranch D, Whitten D. Metal ion-mediated polymer superquenching for highly sensitive detection of kinase and phosphatase activities. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101: 15295–15300
- 62 Lei CY, Xu XH, Zhou J, Liu X, Nie Z, Qing M, Li P, Huang Y. A mix-and-read fluorescence strategy for the switch-on probing of kinase activity based on an aptameric-peptide/graphene-oxide platform. *Chem Asian J*, 2014, 9: 2560–2567
- 63 Xu XH, Liu X, Nie Z, Pan YL, Guo ML, Yao SZ. Label-free fluorescent detection of protein kinase activity based on the aggregation behavior of unmodified quantum dots. *Anal Chem*, 2011, 83: 52–59
- 64 Wang Y, Zhang L, Liang RP, Bai JM, Qiu JD. Using grapheme quantum dots as photoluminescent probes for protein kinase sensing. *Anal Chem*, 2013, 85: 9148–9155
- 65 Wen Q, Gu Y, Tang LJ, Yu RQ, Jiang JH. Peptide-templated gold nanocluster beacon as a sensitive, label-free sensor for protein post-translational modification enzymes. *Anal Chem*, 2013, 85: 11681–11685
- 66 Song W, Wang Y, Liang RP, Zhang L, Qiu JD. Label-free fluorescence assay for protein kinase based on peptide biomineralized gold nanoclusters as signal sensing probe. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 234–240
- 67 Song W, Liang RP, Wang Y, Zhang L, Qiu JD. Green synthesis peptide-templated gold nanoclusters as a novel fluorescence probe for detecting protein kinase activity. *Chem Commun*, 2015, 51: 10006–10009
- 68 Shen CC, Xia XD, Hu SQ, Yang MH, Wang JX. Silver nanoclusters-based fluorescence assay of protein kinase activity and inhibition. *Anal Chem*, 2015, 87: 693–698
- 69 Pezzato C, Zaramella D, Martinelli M, Pieters G, Pagano MA, Prins LJ. Label-free fluorescence detection of kinase activity using a gold nanoparticle based indicator displacement assay. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 1198–1203
- 70 Kerman K, Chikae M, Yamamura S, Tamiya E. Gold nanoparticle-based electrochemical detection of protein phosphorylation. *Anal Chim Acta*, 2007, 588: 26–33
- 71 Ji J, Yang H, Liu Y, Chen H, Kong JL, Liu BH. TiO₂-assisted silver enhanced biosensor for kinase activity profiling. *Chem Commun*, 2009, 12: 1508–1510
- 72 Brabec V, Mornstein V. Electrochemical behavior of proteins at graphite electrodes: II. Electrooxidation of amino acids. *Biophys Chem*, 1980, 12: 159–165
- 73 Kerman K, Vestergaard M, Chikae M, Yamamura S, Tamiya E. Label-free electrochemical detection of the phosphorylated and non-phosphorylated forms of peptides based on tyrosine oxidation. *Electrochem Commun*, 2007, 9: 976–980
- 74 Yang Y, Guo LH, Qu N, Wei MY, Zhao LX, Wan B. Label-free electrochemical measurement of protein tyrosine kinase activity and inhibition based on electro-catalyzed tyrosine signaling. *Biosens Bioelectron*, 2011, 28: 284–290
- 75 Kerman K, Vestergaard M, Tamiya E. Label-free electrical sensing of small-molecule inhibition on tyrosine phosphorylation. *Anal Chem*, 2007, 79: 6881–6885
- 76 He XX, Chen ZF, Wang YH, Wang KM, Su J, Yan GP. TiO₂/MWNTs nanocomposites-based electrochemical strategy for label-free assay of casein kinase II activity and inhibition. *Biosens Bioelectron*, 2012, 35: 134–139
- 77 Wang J, Cao Y, Li Y, Li ZQ, Li GX. Electrochemical strategy for detection of phosphorylation based on enzyme-linked electrocatalysis. *J Electroanal Chem*, 2011, 656: 274–278
- 78 Xu XH, Nie Z, Chen JH, Fu YC, Li W, Shen QP, Yao SZ. A DNA-based electrochemical strategy for label-free monitoring the activity and inhibition of protein kinase. *Chem Commun*, 2009, 45: 6946–6948
- 79 Wang ZH, Sun N, He Y, Liu Y, Li JH. DNA assembled gold nanoparticles polymeric network blocks modular highly sensitive electrochemical biosensors for protein kinase activity analysis and inhibition. *Anal Chem*, 2014, 86: 6153–6159
- 80 Xu SJ, Liu Y, Wang TH, Li JH. Highly sensitive electrogenerated chemiluminescence biosensor in profiling protein kinase activity and inhibition using gold nanoparticle as signal transduction probes. *Anal Chem*, 2010, 82: 9566–9572
- 81 Zhao Z, Zhou XM, Xing D. Highly sensitive protein kinase activity assay based on electrochemiluminescence nanoprobes. *Biosens*

Bioelectron, 2012, 31: 299–304

- 82 Chen ZF, He XX, Wang YH, Wang KM, Du YD, Yan GP. Ru(II) encapsulated phosphorylate-terminated silica nanoparticles-based electrochemiluminescent strategy for label-free assay of protein kinase activity and inhibition. *Biosens Bioelectron*, 2013, 41: 519–525
- 83 Liang RP, Xiang CY, Zhao HF, Qiu JD. Highly sensitive electrogenerated chemiluminescence biosensor in profiling protein kinase activity and inhibition using a multifunctional nanoprobe. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 812: 33–40
- 84 Wang ZH, Yan ZY, Sun N, Liu Y. Multiple signal amplification electrogenerated chemiluminescence biosensors for sensitive protein kinase activity analysis and inhibition. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 771–776
- 85 Sun LL, Liu DJ, Wang ZX. Microarray-based kinase inhibition assay by gold nanoparticle probes. *Anal Chem*, 2007, 79: 773–777
- 86 Li T, Liu DJ, Wang ZX. Screening kinase inhibitors with a microarray-based fluorescent and resonance light scattering assay. *Anal Chem*, 2010, 82: 3067–3072
- 87 Li T, Liu X, Liu DJ, Wang ZX. Sensitive detection of protein kinase A activity in cell lysates by peptide microarray-based assay. *Anal Chem*, 2013, 85: 7033–7037
- 88 Li T, Guo LP, Wang ZX. Microarray based Raman spectroscopic detection with gold nanoparticle probes. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23: 1125–1130
- 89 Li T, Liu DJ, Wang ZX. Microarray-based Raman spectroscopic assay for kinase inhibition by gold nanoparticle probes. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24: 3335–3339
- 90 Fang YM, Chen S, Wang W, Shan XN, Tao NJ. Real-time monitoring of phosphorylation kinetics with self-assembled nano-oscillators. *Angew Chem Int Ed*, 2015, doi: 10.1002/anie.201411040
- 91 Kim YP, Oh E, Oh YH, Moon DW, Lee TG, Kim HS. Protein kinase assay on peptide-conjugated gold nanoparticles by using secondary-ion mass spectrometric imaging. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 6816–6819

Novel protein kinase activity assays based on functional nanomaterials

Pei Li, Xin Liu, Binbin Xiang, Yitao Han, Yong Li, Shu Zeng, Zhou Nie^{*}, Shouzhao Yao

State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics; College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China

^{*}Corresponding author (email: niezhou.hnu@gmail.com)

Abstract: Protein phosphorylation catalyzed by protein kinase is one of the most ubiquitous and important post-translational modification and aberrant phosphorylation is closely related with a variety of human diseases, especially cancer. As the critical component of intracellular signal pathways, protein kinases are involved in regulating a number of important physiological processes, such as cell growth, metabolism, differentiation, and proliferation. Therefore, developing potent and specific analytical methods of protein kinases are of great significance for biochemical fundamental research, disease diagnosis and treatment, and drug development. In recent years, the growing number of functional nanomaterials have been exploited in the development of protein kinase biosensors. Due to their unique optical, electrical, chemical, and catalytic properties, nanomaterials play crucial roles in several key processes in bio-sensing, such as signal generation and transduction, biosensing interface fabrication, as well as biochemical signal amplification, which greatly improves the analytical performance of kinase biosensors. This paper briefly summarizes the generally used molecular recognition mechanisms of kinase detections, then gives a systematic overview of the nanomaterials-based protein kinases assays classified by the different analytical techniques. Consequently, the future development of protein kinase biosensors is prospected.

Keywords: protein kinase, nanomaterial, biosensor, colorimetry, fluorescence, electrochemistry