



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108693348 A

(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201710231387.5

(22)申请日 2017.04.11

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所
地址 116023 辽宁省大连市中山路457号

(72)发明人 叶明亮 李亚楠

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

权利要求书3页 说明书12页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法

(57)摘要

本发明涉及一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法,该方法是以经过修饰的SH2超亲体为一抗,基于ELISA法,得到待测样品中酪氨酸磷酸化水平的动态变化曲线,检测过程中,以酪氨酸磷酸化标准蛋白为参照样品得到标准曲线,以标准曲线为参照,实现待测样品中酪氨酸磷酸化水平定量分析;该方法成本低、无需样品预富集、特异性好、检测限低。此外,ELISA法在孔板中进行,仪器简单。所采用的SH2超亲体可通过细菌表达、纯化得到大量结构稳定的蛋白,大大节约了实验成本,背景清楚,方便改造。其对酪氨酸磷酸化蛋白具有和抗体一样的高亲和高特异性且相对广谱的特点,成功实现对多个复杂样品的酪氨酸磷酸化水平定量分析。

1. 一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法,其特征在于:

以经过修饰的SH2超亲体为一抗,基于酶联免疫吸附法(ELISA法)作为定量分析方法,得到待测样品中酪氨酸磷酸化水平的动态变化曲线,检测过程中,以酪氨酸磷酸化标准蛋白为参照样得到标准曲线,以标准曲线为参照,实现待测样品中酪氨酸磷酸化水平定量分析;

具体为:以已知质量浓度的进行梯度稀释的酪氨酸磷酸化标准蛋白作为参照样与梯度稀释的待测样品按照酶联免疫吸附法进行定量分析,对参照样中不同质量浓度所含酪氨酸磷酸化蛋白质量与信号强度值建立标准曲线,所述参照样品的标准曲线的横坐标为参照样品的蛋白质量,纵坐标为信号强度值;并将一同操作条件的待测样品的动态变化曲线插入该标准曲线,所述待测样品的动态变化曲线的纵坐标为信号强度值,根据信号强度值与参照样品的标准曲线的纵坐标进行比对,得到待测样品中相同信号强度值对应酪氨酸磷酸化蛋白质的质量。

2. 根据权利要求1所述的定量分析方法,其特征在于:

通过所述定量分析方法同时定量分析多个复杂待测样品的酪氨酸磷酸化蛋白水平。

3. 根据权利要求1所述的定量分析方法,其特征在于:

所述SH2超亲体氨基酸序列No.1为:

WYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFVRESETVKAYALSVSDFDNAKGLNVKHYLIRKLDGGFYITSRQF
NSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSK。

4. 根据权利要求1所述的定量分析方法,其特征在于:

所述SH2超亲体的修饰方法可以为细菌表达、纯化或生物素化修饰以获得稳定的SH2超亲体。

5. 根据权利要求4所述的定量分析方法,其特征在于:

所述细菌表达、纯化步骤为:

将转染了序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶标签的SH2超亲体融合蛋白的质粒的大肠杆菌在含有5-500g/mL抗生素的LB(Luria-Broth)液体培养基中培养至OD₆₀₀为0.6-0.8后,向培养基中加入0.1-1.0mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),4-37°C,100-500转/分钟,摇床中震荡过夜,之后4-37°C离心10-30分钟收集细菌菌体,裂解液重悬,超声提取蛋白,再次4-37°C离心10-30分钟,并收集上清;利用组氨酸标签首先通过镍柱纯化SH2超亲体蛋白,上样后,通过5-100mM咪唑洗涤除去细菌裂解液中的杂蛋白,200-500mM咪唑洗脱SH2超亲体蛋白,凝胶排阻柱除去咪唑,进一步纯化SH2超亲体蛋白,测定蛋白质浓度,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定蛋白质纯度,得到细菌表达、纯化后的SH2超亲体蛋白;

所述生物素化修饰方法为:

取0.2-10mg/mL SH2超亲体与生物素化试剂生物素-NHS以摩尔比为1:1-1:10避光震荡反应,4-37°C反应1-24小时;

向反应体系中加入过量(SH2超亲体与NH₄Cl摩尔比大于1)的NH₄Cl终止反应;反应后的溶液用10k超滤管超滤,PBS洗涤后倒置超滤管,收集液体;使用BCA法测定得到的SH2超亲体与生物素交联后的溶液(SH2-生物素)的浓度;使用HABA法测定得到的SH2-生物素溶液平均每个SH2上标记生物素个数;使用ELISA方法评价最佳比例;最后将得到的SH2-生物素溶液分装,-20~-80°C冻存待用。

6. 根据权利要求1所述的定量分析方法,其特征在于:

所述待测样品和参照样品种为带有酪氨酸磷酸化修饰的蛋白或肽段,例如 phosphotyrosine-BSA、带有酪氨酸磷酸化位点的表皮因子生长受体蛋白、细胞裂解液、组织提取蛋白、细胞酶解液、带有酪氨酸磷酸化位点修饰的肽段。

7. 根据权利要求1或2所述的定量分析方法,其特征在于:

将经过修饰的SH2超亲体作为一抗,利用酶联免疫吸附测定方法,定量分析待测样品中酪氨酸磷酸化蛋白水平,具体步骤如下:

步骤1) 用包被缓冲液梯度稀释待测样品抗原至浓度为0.0005ng/mL-10mg/mL,加入固相载体孵育一段时间,移去包被缓冲液,洗涤液洗涤除去未结合的抗原和杂质,除去液体,得到固相抗原;向孔板中加入封闭液孵育一段时间,移去封闭液,洗涤液洗涤除去未结合的封闭蛋白,除去液体;向固相载体中加入0.005mg/mL-3mg/mL的SH2超亲体,使之与固相抗原接触反应,使SH2超亲体与待测样品或参照样品种中的酪氨酸磷酸化位点结合而停留于孔板上;

步骤2) 洗涤液洗涤除去未结合的以及一些非特异性吸附的SH2超亲体,除去液体,之后,按照下述三种检测方式中的一种对信号强度进行检测:

第一种:若SH2超亲体自身带有可供检测的修饰基团,则根据修饰基团的类型进行相应的信号强度检测;

第二种:根据SH2超亲体所带标签和修饰基团的不同而选取相应的带有可供信号检测的基团标记的二抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,根据二抗所带可供信号检测的基团进行相应的信号强度检测;

第三种:根据SH2超亲体所带标签或修饰基团的不同而选取相应的二抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,加入相应的带有可供信号检测的基团标记的三抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,根据二抗所带可供信号检测的基团进行相应的信号强度检测;

步骤3) 信号强度检测之后,根据待测样品检测结果信号强度值的高低来定量分析不同待测样品中酪氨酸磷酸化水平,具体为:以已知浓度的进行梯度稀释的酪氨酸磷酸化标准蛋白作为参照样品种与梯度稀释的待测样品进行酶联免疫吸附法进行定量分析,对参照样品种中酪氨酸磷酸化蛋白质量与信号强度值建立标准曲线,所述参照样品种的标准曲线的横坐标为参照样品种的蛋白质量,纵坐标为化学发光信号强度值;并将一同操作的待测样品的动态变化曲线插入该标准曲线,所述待测样品的动态变化曲线的纵坐标为信号强度值,根据信号强度值与参照样品种的标准曲线的纵坐标进行比对,得到待测样品中酪氨酸磷酸化蛋白质的质量。

8. 根据权利要求7所述的定量分析方法,其特征在于:

所述包被待测样品、封闭液封闭、孵育SH2超亲体、孵育二抗、孵育三抗的实验条件均为4-37°C,反应10分钟-48小时;

所述包被缓冲液选自浓度为20-500mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲盐体系(HEPES),三羟甲基氨基甲烷缓冲盐体系(Tris),三乙胺硼烷缓冲盐体系(TEAB),碳酸盐缓冲盐体系(NH₄HCO₃、Na₂CO₃)或磷酸盐缓冲体系与150-500mM氯化钠的混合,pH 6-10;

所述固相载体为384孔板、96孔板、48孔板、24孔板、12孔板或6孔板;

所述封闭液为能够与固相载体空白位点结合,而不与待测样品发生交叉反应的含一定

浓度封闭蛋白的洗涤液或者Protein-Free封闭液,其中封闭蛋白为牛血清白蛋白、脱脂奶粉、鱼明胶、哺乳动物血清,封闭蛋白的质量浓度为1wt.%-10wt.%;

所述洗涤液选自浓度为20-500mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲盐体系(HEPES),三羟甲基氨基甲烷缓冲盐体系(Tris),三乙胺硼烷缓冲盐体系(TEAB),碳酸氢铵缓冲盐体系(NH_4HCO_3)或磷酸盐缓冲体系与150-500mM氯化钠混合,pH 6-9,其中,洗涤液中加入吐温或Triton X-100作为去污剂,加入量(v/v)为0.0005%-10%。

一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质组学研究方向酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术领域,具体涉及一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法。

背景技术

[0002] 酪氨酸磷酸化信号转导系统参与许多重要的细胞生物学功能,如细胞分化、增殖、迁徙和凋亡等等(文献:Hunter,T.,Cell 2000,100,113-127.),当其发生异常时,常常伴随疾病的发生,尤其是癌症(文献:Rix,U.;Superti-Furga,G.,Nat.Chem.Biol.2009,5,616-624.)。因此,对酪氨酸磷酸化信号通路的研究是目前生物学领域的一个重点,截止目前,美国食品药品监督管理局(FDA)批准的26款用于癌症靶向治疗的激酶抑制剂中,22个(84%)靶向酪氨酸磷酸化激酶(文章:Gharwan,H.;Groninger,H.,Nat.Rev.Clin.Oncol.2009,advance online publication.)。为了更深入的理解和研究酪氨酸磷酸化调控网络,为酪氨酸磷酸化激酶功能失调相关的癌症分子诊治提供基础,我们有必要发展创新的技术手段用于酪氨酸磷酸化蛋白质的定性定量分析。

[0003] 然而,酪氨酸磷酸化仅占有所有蛋白质磷酸化比例的约0.05%,而且它是一个动态、瞬变的过程(文章:Hunter,T.,Cold Spring Harb Perspect Biol 2014,6,a020644.)。这也给酪氨酸磷酸化蛋白的定量分析带来了很大困难。最近,Tao课题组基于用钛离子多功能修饰的pIMAGO试剂发展了一种对复杂样品总体磷酸化水平定量分析的新方法(文章:Pan,L.;Wang,L.;Hsu,C.C.;Zhang,J.;Iliuk,A.;Tao,W.A.,Analyst 2015,140,3390-3396.;文章:Iliuk,A.;Martinez,J.S.;Hall,M.C.;Tao,W.A.,Anal.Chem.2011,83,2767-2774.;文章:Iliuk,A.;Li,L.;Melesse,M.;Hall,M.C.;Tao,W.A.,Chembiochem 2016,17,900-903.)。然而,该方法无法区分所定量分析的磷酸化发生在丝氨酸、苏氨酸还是酪氨酸上,因此,其不能用于复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白的定量分析。此外,近年来,随着质谱技术的发展,质谱成为蛋白质组学研究的一个重要工具。其中,复杂样品在质谱分析之前,基于抗体的预富集是非常必要的(文章:Rush,J.,Moritz,A.,Lee,K.A.,Guo,A.,Goss,V.L.,Spek,E.J.,Zhang,H.,Zha,X.M.,Polakiewicz,R.D.,and Comb,M.J.(2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells.Nature biotechnology 23,94-101.)。目前,商品化的酪氨酸磷酸化抗体也出现了很多,如:PT66、anti-pTyr-4G10、PY99、P-Tyr-100。但是,这些抗体价格昂贵,批次之间重复性往往较差,量少,考虑到有大量的酪氨酸磷酸化位点需要鉴定,昂贵的抗体很难满足这种需求。除此之外,质谱在用于复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白定量分析时还面临着一些困难:首先,很多研究者可能接触不到质谱检测所需要的昂贵的专业仪器;其次,基于质谱的定量分析所需要的样品量往往较大;更重要的是,其单次实验可同时定量分析的样品数量有限。由此,一些生物学的方法如酶联免疫吸附测定,作为质谱分析方法一个很好的替代方法,常常用于复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白的定量分析,但是目前其也主要依赖酪氨酸磷酸化抗体,也因此该方法同样面临着质谱分析中抗体所面临的问题。

[0004] 自1986年,研究者发现Src同源结构域2 (SH2) 在细胞中能特异性的与酪氨酸磷酸化蛋白质进行结合(文章:Yaffe,M.B.,*Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*2002,3,177-186.;文章:Anderson,D.;Koch,C.;Grey,L.;Ellis,C.;Moran,M.;Pawson,T.,*Science* 1990,250,979-982.;文章:Matsuda,M.;Mayer,B.J.;Hanafusa,H.,*Mol.Cell.Biol.*1991,11,1607-1613.)。因此,将SH2结构域用于细胞内酪氨酸磷酸化蛋白质的分析,有望得到生理状态下细胞内酪氨酸激酶通路信息,这将对传统的基于抗体的酪氨酸磷酸化蛋白质组学的一个重要补充。由此,研究者发展了许多新的酪氨酸磷酸化蛋白分析的方法,如far-western blotting,SH2rosette assay,oligonucleotide-tagged multiplex (OTM) assay,etc(文章:Machida,K.;Mayer,B.J.;Nollau,P.,*Mol.Cell.Proteomics* 2003,2,215-233.;文章:Uezu,A.;Okada,H.;Murakoshi,H.;del Vescovo,C.D.;Yasuda,R.;Diviani,D.;Soderling,S.H.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*2012,109,E2929-E2938.;文章:Nollau,P.;Mayer,B.J.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*2001,98,13531-13536.)。然而,为适应细胞中瞬时、动态的蛋白质间相互作用,天然的SH2结构域与酪氨酸磷酸化位点的结合强度温和, K_d 值通常在0.1-10M(文章:Ladbury,J.E.;Lemmon,M.A.;Zhou,M.;Green,J.;Botfield,M.C.;Schlessinger,a.J.,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*1995,92,3199-3203.)。比抗体抗原之间的结合力弱很多。此外,目前,在人类基因组中111个蛋白中发现了121种SH2结构域(文章:Liu,B.A.;Shah,E.;Jablonowski,K.;Stergachis,A.;Engelmann,B.;Nash,P.D.,*Sci.Signal.*2011,4,ra83.)。不同SH2结构域对酪氨酸磷酸化位点的识别特异性不同(文章:Zhou Songyang;Steven E.Shoelson;Manas Chaudhuri;Gerald Gish;Tony Pawson;Wayne G.Haser;Fred King;Tom Roberts;Sheldon Ratnofsky;Robert J.Lehleider;Benja分钟G.Neel;Raymond B.Birge;J.Eduardo Fajardo;Margaret M.Chou;Introduction Hidesaburo Hanafusa;Brian Schaffhausen,a.L.C.C.,*Cell* 1993,72,767-778.)。也就是说,基于天然的SH2结构域的酶联免疫吸附测定方法只能分析某一类的酪氨酸磷酸化蛋白,而不能用于总体酪氨酸磷酸化蛋白水平的定量分析。

[0005] 最近,我们研究发现,一种由天然的SH2结构域突变而来的SH2超亲体可以作为抗体的一个很好的替代物用于复杂样品酪氨酸磷酸化蛋白质组分析(文章:Bian,Y.;Li,L.;dong,M.;Liu,X.;Kaneko,t.;Cheng,K.;Liu,H.;Voss,C.;Cao,X.;Wang,Y.;Litchfield,d.;Ye,M.;Li,S.S.-C.;Zou,H.,*Nat.Chem.Biol.*2016,12,959-966)。通过在SH2结构域与酪氨酸磷酸化位点的结合口袋引入三个氨基酸突变,解离常数达到了与抗体抗原相当的纳摩尔水平,即使是与几乎没有侧链帮助结合的GGpYGG肽段之间结合的解离常数也达到亚微摩尔级别(文章:Kaneko,T.;Huang,H.;Cao,X.;Li,X.;Li,C.;Voss,C.;Sidhu,S.S.;Li,S.S.,*Sci.Signal.*2012,5,ra68.)。在该研究中,我们共从九个细胞系中共鉴定到约20 000不同的酪氨酸磷酸化肽段和超过10 000个酪氨酸磷酸化位点,达到了对酪氨酸磷酸化蛋白质组学分析的空前的深度,基于该超亲体的研究策略比传统的基于抗体的研究策略也获得了更深和更广的酪氨酸磷酸化蛋白组学数据。此外,文献调研发现,目前有许多比较成熟的方法应用于蛋白质浓度的测定,如BCA法,考马斯亮蓝法等,但是,却很少有报道的方法用于磷酸化蛋白的分析。最近,Tao课题组基于一种钛离子修饰的pIMAGO实现了磷酸化蛋白水平的定量分析,然而,该方法无法区分磷酸化发生在丝氨酸、苏氨酸还是酪氨酸上。由此,我们希望将SH2超亲体代替昂贵的抗体应用于酶联免疫吸附测定方法,以期实现对多个复杂样

品的酪氨酸磷酸化水平定量分析。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种成本低、不需要样品预富集、特异性好、检测限低的高通量酪氨酸磷酸化蛋白定量分析方法。

[0007] 本发明提出的高通量酪氨酸磷酸化定量分析方法,利用SH2超亲体对酪氨酸磷酸化蛋白高亲和高特异性的优势,实现了检测灵敏度低于传统抗体方法的酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法。

[0008] 本发明采用的技术方案为:

[0009] 一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法:

[0010] 以经过修饰的SH2超亲体为一抗,基于酶联免疫吸附法(ELISA法)作为定量分析方法,得到待测样品中酪氨酸磷酸化水平的动态变化曲线,检测过程中,以酪氨酸磷酸化标准蛋白为参照样得到标准曲线,以标准曲线为参照,实现待测样品中酪氨酸磷酸化水平定量分析;

[0011] 具体为:以已知质量浓度的进行梯度稀释的酪氨酸磷酸化标准蛋白作为参照样与梯度稀释的待测样品按照酶联免疫吸附法进行定量分析,对参照样中不同质量浓度所含酪氨酸磷酸化蛋白质量与信号强度值建立标准曲线,所述参照样品的标准曲线的横坐标为参照样品的包被蛋白质量,纵坐标为信号强度值;并将一同操作条件的待测样品的动态变化曲线插入该标准曲线,所述待测样品的动态变化曲线的纵坐标为信号强度值,根据信号强度值与参照样品的标准曲线的纵坐标进行比对,得到待测样品中相同信号强度值对应酪氨酸磷酸化蛋白的质量。

[0012] 通过所述定量分析方法同时定量分析多个复杂待测样品的酪氨酸磷酸化蛋白水平。

[0013] 所述SH2超亲体氨基酸序列No.1为:

[0014]

WYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETVKGAYALSVSDFDNAKGLNVKHYLIRKLDSGGFYITSRQFNSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSK。

[0015] 所述SH2超亲体的修饰方法可以为细菌表达、纯化或生物素化修饰以获得稳定的SH2超亲体。

[0016] 所述细菌表达、纯化步骤为:

[0017] 将转染了序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶标签的SH2超亲体融合蛋白的质粒的大肠杆菌在含有5-500g/mL抗生素的LB(Luria-Broth)液体培养基中培养至OD₆₀₀为0.6-0.8后,向培养基中加入0.1-1.0mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),4-37°C,100-500转/分钟,摇床中震荡过夜,之后4-37°C离心10-30分钟收集细菌菌体,裂解液重悬,超声提取蛋白,再次4-37°C离心10-30分钟,并收集上清;利用组氨酸标签首先通过镍柱纯化SH2超亲体蛋白,上样后,通过5-100mM咪唑洗涤除去细菌裂解液中的杂蛋白,200-500mM咪唑洗脱SH2超亲体蛋白,凝胶排阻柱除去咪唑,并可进一步纯化SH2超亲体蛋白,测定蛋白质浓度,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定蛋白质纯度,得到细菌表达、纯化后的SH2超亲体蛋白;

[0018] 所述生物素化修饰方法为：

[0019] 取0.2-10mg/mL SH2超亲体与生物素化试剂生物素-NHS以摩尔比为1:1-1:10避光震荡反应,4-37°C反应1-24小时；

[0020] 向反应体系中加入过量(SH2超亲体与NH₄Cl摩尔比大于1)的NH₄Cl终止反应；反应后的溶液用10k超滤管超滤,PBS洗涤后倒置超滤管,收集液体；使用BCA法测定得到的SH2超亲体与生物素交联后的溶液(SH2-生物素)的浓度；使用HABA法测定得到的SH2-生物素溶液平均每个SH2上标记生物素个数；使用ELISA方法评价最佳比例；最后将得到的SH2-生物素溶液分装,-20~-80°C冻存待用。

[0021] 所述待测样品和参照样品为带有酪氨酸磷酸化修饰的蛋白或肽段,例如phosphotyrosine-BSA、带有酪氨酸磷酸化位点的表皮因子生长受体蛋白、细胞裂解液、组织提取蛋白、细胞酶解液、带有酪氨酸磷酸化位点修饰的肽段。

[0022] 将经过修饰的SH2超亲体作为一抗,利用酶联免疫吸附测定方法,定量分析待测样品中酪氨酸磷酸化蛋白水平,具体步骤如下：

[0023] 步骤1)用包被缓冲液梯度稀释待测样品抗原至浓度为0.0005ng/mL-10mg/mL,加入固相载体孵育一段时间,移去包被缓冲液,洗涤液洗涤除去未结合的抗原和杂质,除去液体,得到固相抗原；向孔板中加入封闭液孵育一段时间,移去封闭液,洗涤液洗涤除去未结合的封闭蛋白,除去液体；向固相载体中加入0.005mg/mL-3mg/mL的SH2超亲体,使之与固相抗原接触反应,使SH2超亲体与待测样品或参照样品中的酪氨酸磷酸化位点结合而停留于孔板上；

[0024] 步骤2)洗涤液洗涤除去未结合的以及一些非特异性吸附的SH2超亲体,除去液体,之后,按照下述三种检测方式中的一种对信号强度进行检测：

[0025] 第一种:若SH2超亲体自身带有可供检测的修饰基团,则根据修饰基团的类型进行相应的信号强度检测；

[0026] 第二种:根据SH2超亲体所带标签和修饰基团的不同而选取相应的带有可供信号检测的基团标记的二抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,根据二抗所带可供信号检测的基团进行相应的信号强度检测；

[0027] 第三种:根据SH2超亲体所带标签或修饰基团的不同而选取相应的二抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,加入相应的带有可供信号检测的基团标记的三抗孵育,洗涤液洗涤,除去液体,根据二抗所带可供信号检测的基团进行相应的信号强度检测；

[0028] 步骤3)信号强度检测之后,根据待测样品检测结果信号强度值的高低来定量分析不同待测样品中酪氨酸磷酸化水平,具体为:以已知浓度的进行梯度稀释的酪氨酸磷酸化标准蛋白作为参照样品与梯度稀释的待测样品进行酶联免疫吸附法进行定量分析,对参照样品中酪氨酸磷酸化蛋白质量与信号强度值建立标准曲线,所述参照样品的标准曲线的横坐标为参照样品的蛋白质量,纵坐标为化学发光信号强度值；并将一同操作的待测样品的动态变化曲线插入该标准曲线,所述待测样品的动态变化曲线的纵坐标为信号强度值,根据信号强度值与参照样品的标准曲线的纵坐标进行比对,得到待测样品中酪氨酸磷酸化蛋白质的质量。

[0029] 所述包被待测样品、封闭液封闭、孵育SH2超亲体、孵育二抗、孵育三抗的实验条件均为4-37°C,反应10分钟-48小时；

[0030] 所述包被缓冲液选自浓度为20-500mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲盐体系(HEPES),三羟甲基氨基甲烷缓冲盐体系(Tris),三乙胺硼烷缓冲盐体系(TEAB),碳酸盐缓冲盐体系(NH_4HCO_3 、 Na_2CO_3)或磷酸盐缓冲体系与150-500mM氯化钠的混合,pH 6-10;

[0031] 所述固相载体为384孔板、96孔板、48孔板、24孔板、12孔板或6孔板;

[0032] 所述封闭液为能够与固相载体空白位点结合,而不与待测样品发生交叉反应的含一定浓度封闭蛋白的洗涤液或者Protein-Free封闭液,其中封闭蛋白为牛血清白蛋白、脱脂奶粉、鱼明胶、哺乳动物血清,封闭蛋白的质量浓度为1wt.%-10wt.%;

[0033] 所述洗涤液选自浓度为20-500mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲盐体系(HEPES),三羟甲基氨基甲烷缓冲盐体系(Tris),三乙胺硼烷缓冲盐体系(TEAB),碳酸氢铵缓冲盐体系(NH_4HCO_3)或磷酸盐缓冲体系与150-500mM氯化钠混合,pH 6-9,其中,洗涤液中加入吐温或Triton X-100作为去污剂,加入量(v/v)为0.0005%-10%。

[0034] 本发明的优点:

[0035] 该酪氨酸磷酸化蛋白定量分析方法具有明显的优点:成本低、不需要样品预富集、特异性好、检测限低,检测灵敏度(0.025ng)比酪氨酸磷酸化抗体作为一抗方法的检测灵敏度(0.1ng)至少降低了4倍。此外,酶联免疫吸附测定方法在孔板中进行,可同时多个样品的酪氨酸磷酸化水平定量分析,仪器简单。本发明所采用的SH2超亲体可通过细菌表达、纯化得到大量的结构稳定的蛋白,大大节约了实验成本,背景清楚,方便改造。更重要的是,其对酪氨酸磷酸化蛋白具有和抗体一样的高亲和高特异性且相对广谱的特点,成功实现了对多个复杂样品的酪氨酸磷酸化水平定量分析。

附图说明

[0036] 图1为所述SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平的流程图。

[0037] 图2为SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)的质粒示意图。

[0038] 图3为SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析镍柱、琼脂糖凝胶纯化SH2超亲体蛋白(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)的结果图。

[0039] 图4为考察SH2超亲体作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平能力的结果图。

[0040] 图5为考察生物素化的SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平能力的结果图。

[0041] 图6为考察SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平能力的结果图。

[0042] 图7为通过免疫印迹法(immunoblotting,IB)使用抗体p44/42MAPK(Erk1/2)(137F5)、phospho-p44/42MAPK(Erk1/2)(a)以及磷酸化表皮生长因子受体抗体试剂盒(b)验证EGF刺激效果。

[0043] 图8为SH2超亲体作为一抗,定量分析表皮生长因子刺激不同分钟的HeLa细胞裂解液中酪氨酸磷酸化蛋白质水平的结果图。

具体实施方式

[0044] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。

[0045] 如图1所示为经过修饰的SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签,第三种检测方式)作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平的流程图。梯度稀释的酪氨酸磷酸化蛋白参照样品种与一定浓度的待测样品同时孵育于同一个96孔板中,首先通过SH2超亲体特异性的识别酪氨酸磷酸化蛋白,并与之结合;然后,谷胱甘肽S转移酶抗体作为二抗识别SH2超亲体上的谷胱甘肽S转移酶标签,并与之结合而固定于孔板上;接着,过氧化物酶标记的抗体作为三抗与谷胱甘肽S转移酶抗体结合;最后,分别加入等量的过氧化物酶底物,并通过检测所产生的化学发光信号强度值来定量分析各样品中酪氨酸磷酸化蛋白的水平。其中每步之间,孔板用温和的洗涤剂洗涤以除去任何的非特异性吸附蛋白。通过将待测样品的化学发光信号强度值插入酪氨酸磷酸化蛋白参照样品种所建立的标准曲线,从而可知一定量的待测样品所相当的酪氨酸磷酸化蛋白参照样品种的量,实现不同次实验中多个复杂样品的酪氨酸磷酸化水平定量分析。

[0046] 如图2所示为SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)的质粒示意图。

[0047] 其中SH2超亲体氨基酸序列为:

[0048]

WYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETVKGAYALSVSDFDNAKGLNVKHYLIRKLDSGGFYITSRTQFNLSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSK。

[0049] 序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签的SH2超亲体融合蛋白氨基酸序列为:

[0050]

MKHHHHHHNTSSNSMSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDV
KLTQSMAIIRYIADKHNLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHK
TYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHP
TSGSGGGGWMSENLYFQGAMDSIQAEWYFGKITRRESERLLLNAENPRGTFLVRESETVKGAYALSVSDFDNAK
GLNVKHYLIRKLDSGGFYITSRTQFNLSLQQLVAYYSKHADGLCHRLTTVCPTSK。

[0051] 图3为SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析镍柱、凝胶层析纯化SH2超亲体蛋白(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)的结果图。细菌表达、纯化SH2超亲体的操作步骤为:1)将转染了序列N端带有6个组氨酸和谷胱甘肽S转移酶标签的SH2超亲体融合蛋白的质粒的大肠杆菌在含有50g/ml抗生素的LB(Luria-Broth)液体培养基中培养至OD₆₀₀为0.6-0.8后,向培养基中加入0.2mM异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),摇床中震荡过夜(18摄氏度,220转/分钟)。2)离心收集细菌菌体(6500g,10-30分钟,4摄氏度),裂解液重悬,超声(200W,工作3s,间隔5s,工作300次)提取蛋白。离心(4摄氏度,25,000g,10-30分钟)并收集上清。3)通过镍柱纯化该SH2超亲体N端含有6个组氨酸标签蛋白:上样后,通过50mM咪唑洗涤来除去细菌裂解液中的杂蛋白,最后500mM咪唑洗脱SH2超亲体蛋白。然后,选择合适的凝胶排阻柱来除去高浓度咪唑,进一步纯化SH2超亲体蛋白。最后,测定蛋白质浓度为2mg/mL,

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 确定蛋白质纯度高。结果如图3所示,利用SH2超亲体N端的组氨酸标签通过镍柱纯化后,可以得到SH2超亲体的纯度很好,谷胱甘肽S转移酶标签也可以增加蛋白的溶解度,大大在增加了其表达量,通过该蛋白表达系统,每毫升菌液中得到0.1-10mg SH2超亲体蛋白。

[0052] 实施例1

[0053] 1) 包被缓冲液 (pH 9.6, 0.1M的碳酸盐,新鲜配制) 稀释a. 酪氨酸磷酸化标准蛋白 phosphotyrosine-BSA (SIGMA) 至0.05ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml, b. EGF刺激1分钟的HeLa细胞裂解液至250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml, c. 2000ng/ml碱性磷酸酶处理0分钟、3分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、60分钟的表皮生长因子刺激20分钟的HeLa细胞裂解液,上述样品均以100 μ L/孔加入96孔板,每个样品平行分别加入三个孔,37摄氏度孵育2小时;

[0054] 2) 将步骤1) 中的溶液移去, TBST (20mM Tris, 150mM NaCl, pH 7.4, 0.05% (v/v) Tween-20) 洗涤三次, 200 μ L/次, 3分钟/次, 最后在无尘纸上拍干;

[0055] 3) 向步骤2) 拍干后的96孔板中加入200 μ L封闭液 (含5wt.%脱脂奶粉的TBST), 37摄氏度反应1小时;

[0056] 4) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0057] 5) 向上述步骤4) 得到的96孔板中加入100 μ L 2 μ g/ml SH2超亲体, 37摄氏度反应2小时;

[0058] 6) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0059] 7) 向上述步骤6) 得到的96孔板中加入100 μ L兔源GST标签抗体 (1:15,000), 37摄氏度反应1小时;

[0060] 8) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0061] 9) 向上述步骤8) 得到的96孔板中加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:10,000), 37摄氏度反应1小时;

[0062] 10) 反应结束后, 先将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0063] 11) 向上述步骤10) 得到的96孔板中加入辣根过氧化物酶底物 (鲁米诺与过氧化氢 (v/v) 1:1混合), 100 μ L/孔, 轻轻振荡1分钟, 酶标仪检测化学发光信号强度值。

[0064] 标准蛋白浓度为0.05ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml的结果如图4 (a) 所示, 为SH2超亲体作为一抗, 考察其对酪氨酸磷酸化标准蛋白 phosphotyrosine-BSA 的检测下限。该方法具有良好的检测线性 ($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, n=3; 光积分时间: 1秒; 增益值: 135), 方法的检测限低, 约为0.025ng, 相比抗体作为一抗的检测方法的检测限 (0.1ng) 降低了四倍。

[0065] 标准蛋白浓度为50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml的结果如图4 (c) 所示, SH2超亲体作为一抗, 考察其对酪氨酸磷酸化标准蛋白 phosphotyrosine-BSA 的检测上限。SH2超亲体 ($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, n=3; 光积分时间: 10毫秒; 增益值: 110) 为一抗的检测结果具有良好的线性关系。该方法的检测上限约100ng标准蛋白 phosphotyrosine-BSA, 与P-Tyr-100为一抗的检测方法的检测上限相同。

[0066] EGF刺激1分钟的HeLa细胞裂解液为250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、

5000ng/ml的检测结果如图4(e)所示,SH2超亲体作为一抗检测梯度稀释的复杂样品表皮生长因子刺激1分钟的HeLa细胞裂解液中的酪氨酸磷酸化蛋白的结果图。该方法对复杂样品的检测同样表现良好的检测线性($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, $n = 3$; 光积分时间:1秒;增益值:135)。

[0067] 2000ng/ml碱性磷酸酶处理0分钟、3分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、60分钟的表皮生长因子刺激20分钟的HeLa细胞裂解液的检测结果如图4(f)所示,为SH2超亲体作为一抗检测碱性磷酸酶处理不同时间的表皮生长因子刺激20分钟的HeLa细胞裂解液中的酪氨酸磷酸化蛋白的结果图($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, $n = 3$; 光积分时间:1秒;增益值:135)。随着碱性磷酸酶的处理,样品中的酪氨酸磷酸化水平很快降低,进一步说明检测到的化学发光信号强度确实与酪氨酸磷酸化水平相关。

[0068] 实施例2

[0069] 1) 包被缓冲液(pH 9.6, 0.1M的碳酸盐,新鲜配制)梯度稀释酪氨酸磷酸化标准蛋白phosphotyrosine-BSA(SIGMA)为0.1ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml以及50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml,100 μ L/孔加入96孔板,每个样品平行加入三个孔,37摄氏度孵育2小时;

[0070] 2) 将步骤1)中的溶液移去,TBST(20mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH7.4,0.05% (v/v) Tween-20)洗涤三次,200 μ L/次,3分钟/次,最后在无尘纸上拍干;

[0071] 3) 向步骤2)拍干后的96孔板中加入200 μ L封闭液(含5wt.%脱脂奶粉的TBST),37摄氏度反应1小时;

[0072] 4) 反应结束后,将96孔板按照步骤2)进行洗涤;

[0073] 5) 向上述步骤4)得到的96孔板中加入100 μ L鼠源酪氨酸磷酸化抗体P-Tyr-100(1:1000),37摄氏度反应2小时;

[0074] 6) 反应结束后,将96孔板按照步骤2)进行洗涤;

[0075] 7) 向上述步骤6)得到的96孔板中加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠抗体(1:10,000),37摄氏度反应1小时;

[0076] 8) 反应结束后,先将96孔板按照步骤2)进行洗涤,

[0077] 9) 向上述步骤8)得到的96孔板中加入辣根过氧化物酶底物(鲁米诺与过氧化氢(v/v)1:1混合),100 μ L/孔,轻轻振荡1分钟,酶标仪检测化学发光信号强度值。

[0078] 标准蛋白浓度为0.05ng/ml、0.25ng/ml、0.5ng/ml、1ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml的结果如图4(b)所示,为P-Tyr-100作为一抗,考察其对酪氨酸磷酸化标准蛋白phosphotyrosine-BSA的检测下限。该方法具有良好的检测线性($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, $n = 3$; 光积分时间:1秒;增益值:135),方法的检测限约为0.1ng,高于SH2超亲体为一抗的检测方法的检测限。

[0079] 标准蛋白浓度为50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、2500ng/ml、5000ng/ml的结果如图4(d)所示,P-Tyr-100作为一抗,考察其对酪氨酸磷酸化标准蛋白phosphotyrosine-BSA的检测上限。P-Tyr-100($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, $n = 3$; 光积分时间:10毫秒;增益值:120)为一抗的检测结果具有良好的线性关系。该方法的检测上限约100ng标准蛋白phosphotyrosine-BSA,与SH2超亲体为一抗的检测方法的检测上限相同。

[0080] 实施例3

[0081] 首先,生物素化SH2超亲体,具体操作为

[0082] 1) 取2ml 2mg/ml SH2超亲体与生物素化试剂如生物素-NHS摩尔比1:5避光震荡反应,4℃过夜;向步骤1)的反应体系中加入的100μL NH₄Cl终止反应30min;

[0083] 2) 将步骤2)反应后的溶液用10k超滤管超滤,PBS洗涤三次后倒置超滤管,收集液体。

[0084] 3) BCA法测定步骤3)得到的SH2超亲体与生物素交联后的溶液(SH2-生物素)的浓度;

[0085] 4) HABA法测定步骤3)得到的SH2-生物素溶液平均每个SH2上标记生物素个数;

[0086] 5) ELISA方法评价最佳比例;

[0087] 6) 将步骤3)得到的SH2-生物素溶液分装,-80℃冻存。

[0088] 其次,用生物素化的SH2超亲体作为一抗,定量分析样品中酪氨酸磷酸化蛋白水平,具体操作为:

[0089] 1) 包被缓冲液(pH 9.6,0.1M的碳酸盐,新鲜配制)梯度稀释酪氨酸磷酸化标准蛋白phosphotyrosine-BSA为25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml,以100μL/孔加入96孔板,每个样品平行分别加入三个孔,37摄氏度孵育2小时;

[0090] 2) 将步骤1)中的溶液移去,TBST(20mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH 7.4,0.05% (v/v)吐温-20)洗涤三次,200μL/次,3分钟/次,最后在无尘纸上拍干;

[0091] 3) 向步骤2)拍干后的96孔板中加入200μL封闭液(含5wt.%的脱脂奶粉的TBST溶液),37摄氏度反应1小时;

[0092] 4) 反应结束后,将96孔板按照步骤2)进行洗涤;

[0093] 5) 向上述步骤4)得到的96孔板中加入100μL 2ug/ml上述生物素化的SH2超亲体,37摄氏度反应2小时;

[0094] 6) 反应结束后,将96孔板按照步骤2)进行洗涤;

[0095] 7) 向上述步骤6)得到的96孔板中加入100μL过氧化物酶标记的联袂亲和素(1:2000),37摄氏度反应1小时;

[0096] 8) 反应结束后,将96孔板按照步骤2)进行洗涤;

[0097] 9) 向上述步骤8)得到的96孔板中加入辣根过氧化物酶底物(鲁米诺与过氧化氢(v/v)1:1混合),100μL/孔,轻轻振荡1分钟,酶标仪检测。

[0098] 如图5所示,为考察生物素的SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签)作为一抗,定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平能力的结果图。所建立的酪氨酸磷酸化标准蛋白质量与化学发光信号强度相关的标准曲线的线性良好($R^2 > 0.97$, Mean \pm SD, n=3;光积分时间:1秒;增益值:135),三个平行重复性比较好。

[0099] 实施例4

[0100] 1) 包被缓冲液(pH 9.6,0.1M的碳酸盐,新鲜配制)梯度稀释酪氨酸磷酸化标准蛋白phosphotyrosine-BSA(SIGMA)至1ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、250ng/ml、500ng/ml,以100μL/孔加入96孔板,每个样品平行分别加入三个孔,37摄氏度孵育2小时;

[0101] 2) 将步骤1)中的溶液移去,TBST(20mM Tris-HCl,150mM NaCl,pH 7.4,0.05wt.%

Tween-20) 洗涤三次, 200 μ L/次, 3分钟/次, 最后在无尘纸上拍干;

[0102] 3) 向步骤2) 拍干后的96孔板中加入200 μ L封闭液(含5wt.%脱脂奶粉的TBST), 37摄氏度反应1小时;

[0103] 4) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0104] 5) 向上述步骤4) 得到的96孔板中加入100 μ L 2 μ g/ml SH2超亲体, 37摄氏度反应2小时;

[0105] 6) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0106] 7) 向上述步骤6) 得到的96孔板中加入100 μ L兔源GST标签抗体(1:15,000), 37摄氏度反应1小时;

[0107] 8) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0108] 9) 向上述步骤8) 得到的96孔板中加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:10,000), 37摄氏度反应1小时;

[0109] 10) 反应结束后, 先将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0110] 11) 向上述步骤10) 得到的96孔板中加入辣根过氧化物酶底物(鲁米诺与过氧化氢(v/v) 1:1混合), 100 μ L/孔, 轻轻振荡1分钟, 酶标仪检测化学发光信号强度值。

[0111] 结果如图6、图3所示, 为考察SH2超亲体(序列N端带有组氨酸和谷胱甘肽S转移酶两个标签) 作为一抗, 定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋白质水平能力的结果图。所建立的酪氨酸磷酸化标准蛋白质量与化学发光信号强度相关的标准曲线的线性良好($R^2 > 0.97$, Mean \pm SD, n=3; 光积分时间: 1秒; 增益值: 118), 三个平行重复性比较好。

[0112] 实施例5

[0113] 首先, 制备蛋白样品制备, 具体为: HeLa细胞采用RPMI1640培养基, 并加入10% (v/v) 牛血清培养。培养基中还含有100Unit/ml青霉素和100Unit/ml链霉素。细胞在含有5%的CO₂空气的37摄氏度培养箱中培养。待HeLa细胞的密度达到培养皿的约80%, 用不含血清的RPMI1640培养基饥饿培养过夜(12-16小时)。然后, 饥饿处理的HeLa细胞培养大皿中加入15ml含有100ng/ml表皮生长因子的RPMI1640培养基分别在37摄氏度培养箱中孵育1, 3, 5, 10, 20分钟, 并将向HeLa细胞培养大皿中加入15ml不含表皮生长因子的RPMI1640培养基为阴性对照。接着, 使用4摄氏度预冷的PBS洗涤细胞三次后, 加入4摄氏度预冷的细胞裂解液, 冰上刮下细胞后, 超声破碎法提取蛋白。细胞裂解液的成分为: 强RIPA, 2%蛋白酶抑制剂(cocktail, v/v) 以及1mM NaF、1mM Na₃VO₄、1mM Na₄O₇P₂、1mM Na₂C₃H₇O₆P。将细胞裂解液高速离心, 采用BCA(bicinchoninic acid)法测定上清液蛋白浓度, 然后分别取等量的表皮生长因子刺激各分钟和未刺激的HeLa细胞裂解液按比例加入上样缓冲液, 100摄氏度煮10分钟, 冷却后, 通过免疫印迹法(immunoblotting, IB) 使用抗体p44/42MAPK(Erk1/2) (137F5)、phospho-p44/42MAPK(Erk1/2) 以及磷酸化表皮生长因子受体抗体试剂盒验证刺激效果, 其余细胞裂解液蛋白分装后在-80摄氏度冰箱保存。

[0114] 其次, SH2超亲体融合蛋白作为一抗, phosphotyrosine-BSA作为酪氨酸磷酸化蛋白参照样品, 利用酶联免疫吸附测定方法定量分析表皮生长因子刺激1分钟、3分钟、5分钟、10分钟、20分钟以及未刺激的HeLa细胞裂解液中的酪氨酸磷酸化蛋白水平的变化。具体操作为:

[0115] 1) 包被缓冲液(pH 9.6, 0.1M的碳酸盐, 新鲜配制) 梯度稀释酪氨酸磷酸化标准蛋

白phosphotyrosine-BSA (SIGMA) 为2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml, 100 μ L/孔,同时,用包被液配制表皮生长因子刺激1分钟、3分钟、5分钟、10分钟、20分钟以及未刺激的HeLa细胞裂解液中的酪氨酸磷酸化蛋白溶液至2ug/ml, 100 μ L/孔加入96孔板,每个样品平行分别加入三个孔,37摄氏度孵育2小时;

[0116] 2) 将步骤1) 中的溶液移去, TBST (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7.4, 0.05% (v/v) Tween-20) 洗涤三次, 200 μ L/次, 3分钟/次, 最后在无尘纸上拍干;

[0117] 3) 向步骤2) 拍干后的96孔板中加入200 μ L封闭液 (含5wt.% 脱脂奶粉的TBST), 37摄氏度反应1小时;

[0118] 4) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0119] 5) 向上述步骤4) 得到的96孔板中加入100 μ L 2ug/ml SH2超亲体, 37摄氏度反应2小时;

[0120] 6) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0121] 7) 向上述步骤6) 得到的96孔板中加入100 μ L兔源GST标签抗体 (1:15,000), 37摄氏度反应1小时;

[0122] 8) 反应结束后, 将96孔板按照步骤2) 进行洗涤;

[0123] 9) 向上述步骤8) 得到的96孔板中加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:10,000), 37摄氏度反应1小时;

[0124] 10) 反应结束后, 先将96孔板按照步骤2) 进行洗涤,

[0125] 11) 向上述步骤10) 得到的96孔板中加入辣根过氧化物酶底物 (鲁米诺与过氧化氢 (v/v) 1:1混合), 100 μ L/孔, 轻轻振荡1分钟, 酶标仪检测化学发光信号强度值。

[0126] 如图7所示, 与文献报道一致 (文献: Blagoev, B.; Ong, S. E.; Kratchmarova, I.; Mann, M. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 1139-1145; 文献: Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnäd, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. *Cell* 2006, 127, 635-648. Iliuk, A.; Li, L.; Melesse, M.; Hall, M. C.; Tao, W. A. *ChemBioChem* 2016, 17, 900-903; 文献: Wolf-Yadlin, A.; Hautaniemi, S.; Lauffenburger, D. A.; White, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007, 104, 5860-5865.), Erk1/2蛋白在表皮生长因子刺激约五分钟附近酪氨酸磷酸化水平最高, 表皮生长因子受体992位的酪氨酸磷酸化水平也是5分钟附近最高, 而1045位和1068位的酪氨酸磷酸化水平在3分钟附近最高。

[0127] 如图8a所示: 所建立的酪氨酸磷酸化标准蛋白质量与化学发光信号强度相关的标准曲线的线性良好 ($R^2 > 0.99$, Mean \pm SD, n=3; 光积分时间: 1秒; 增益值: 129), 三个平行重复性比较好。

[0128] 如图8b所示, 表皮生长因子刺激1分钟后, 化学发光信号强度显著增强, 此时HeLa细胞酪氨酸磷酸化水平最高, 之后逐渐减弱。由此可知, 通过这种方法可以实现同时检测多个复杂样品中酪氨酸磷酸化水平的动态变化。此外, 由建立的酪氨酸磷酸化标准蛋白质量与化学发光信号强度相关的标准曲线可知, 本次实验200ng表皮生长因子刺激1分钟和20分钟的HeLa细胞裂解液中所含有的总的酪氨酸磷酸化蛋白的量分别相当于2.56ng和1.67ng的phosphotyrosine-BSA。通过这种方式使得不同实验条件下分析的样品中酪氨酸磷酸化蛋白水平可以进行比较。

[0129] 本发明为一种利用SH2超亲体实现了高通量定量分析复杂样品中酪氨酸磷酸化蛋

白质水平定量方法。该方法成本低、不需要样品预富集、特异性好、检测限低,检测范围宽。未来,这种方法将在磷酸化蛋白质组学、肿瘤诊断、治疗监测等领域中具有巨大的应用前景。

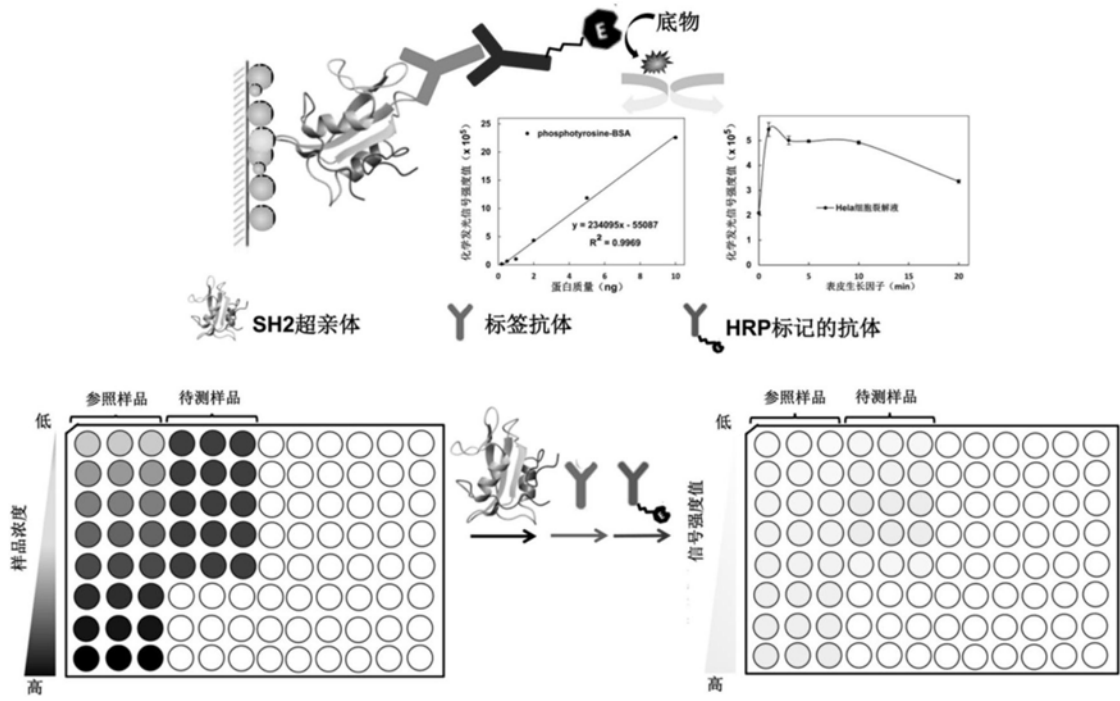


图1

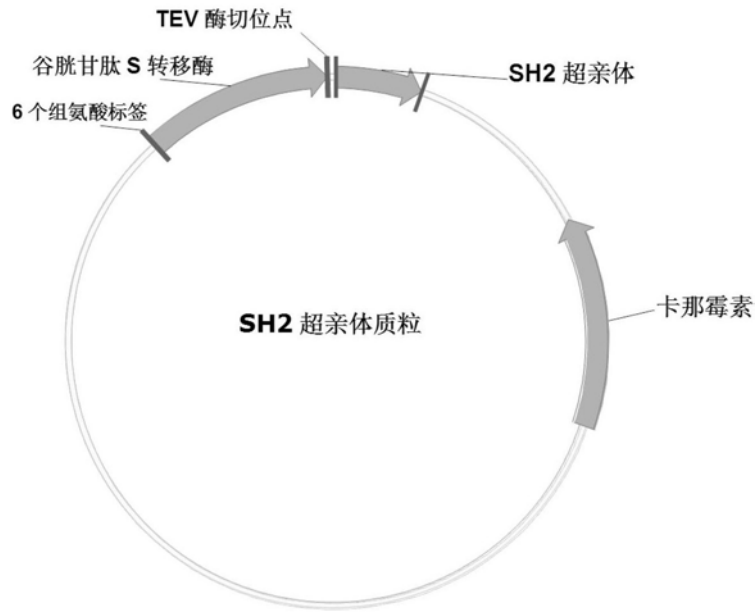


图2

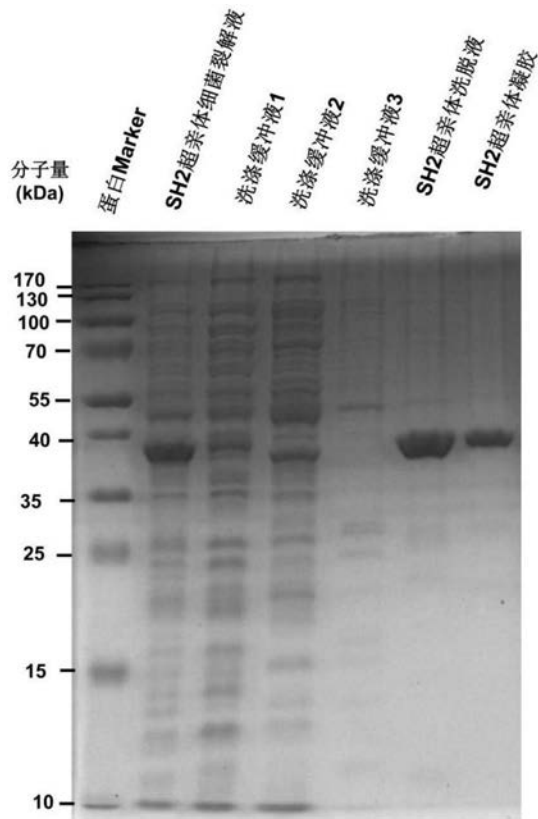


图3

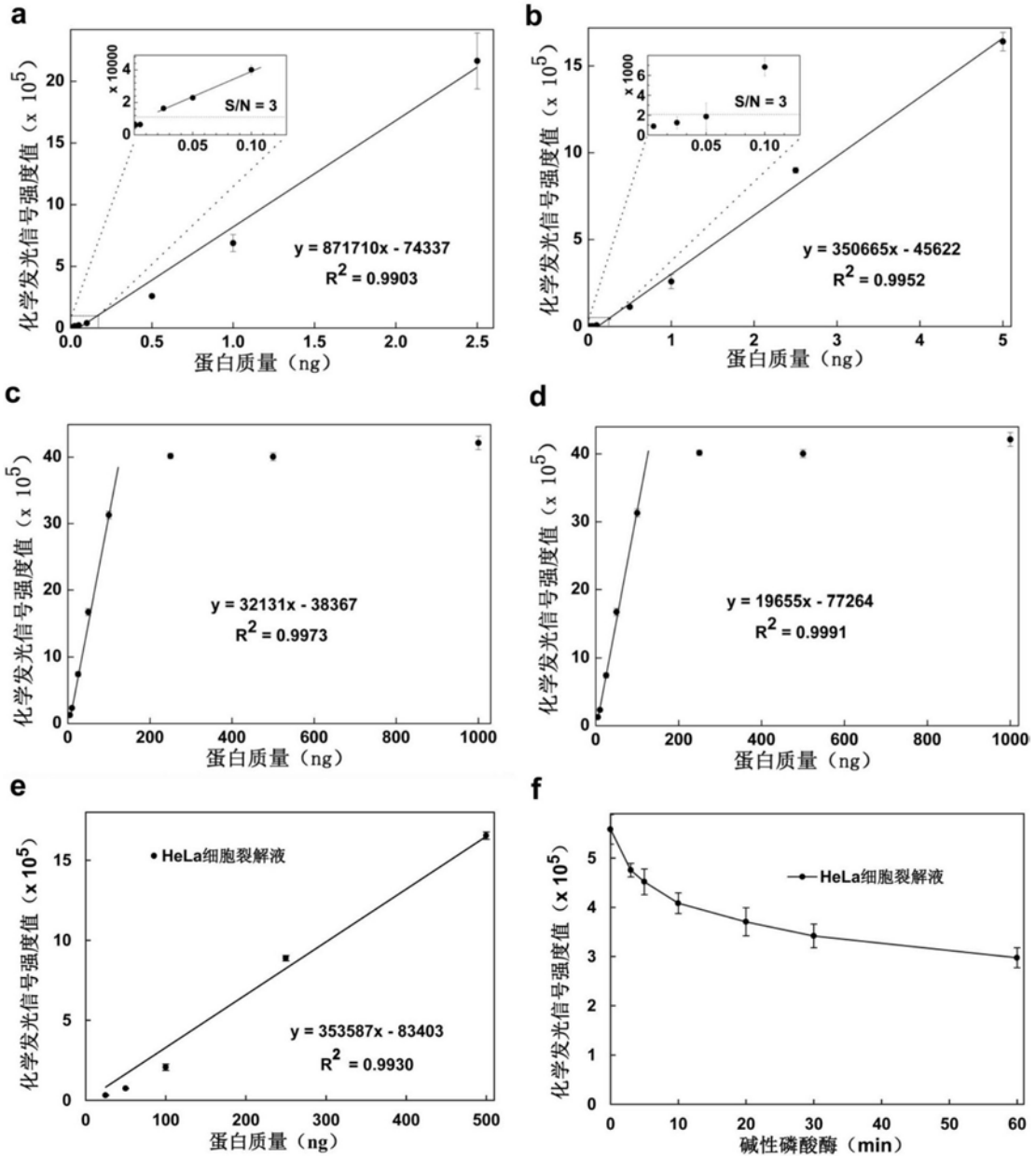


图4

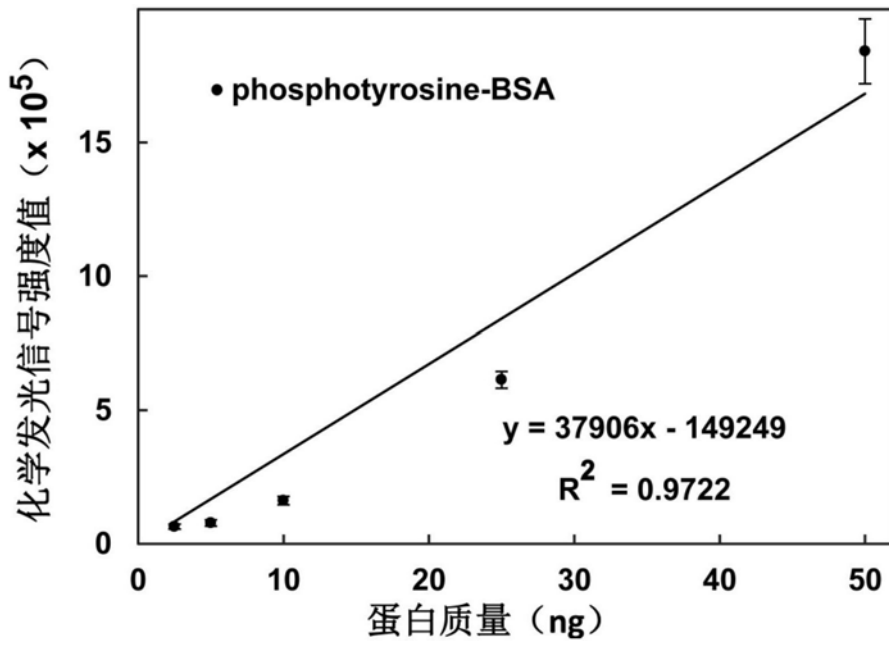


图5

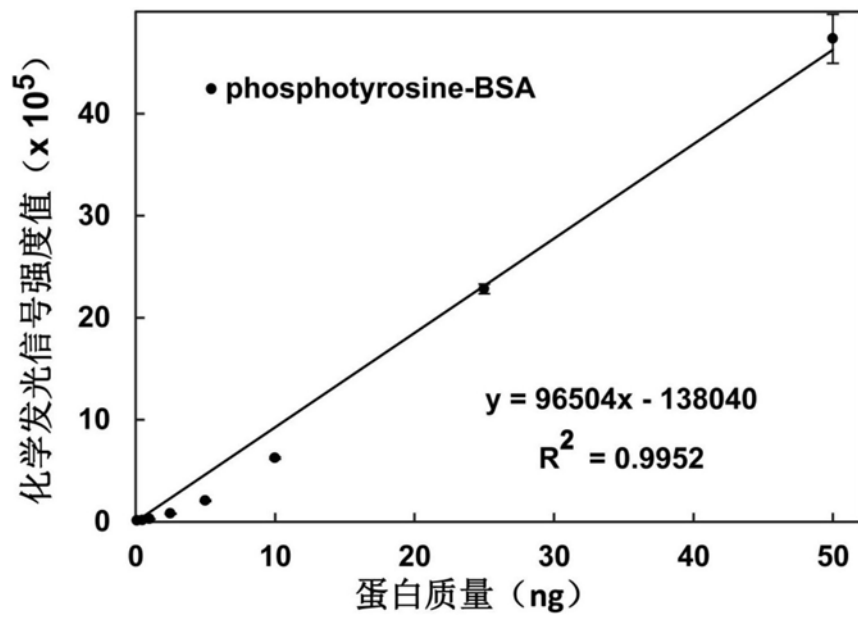


图6

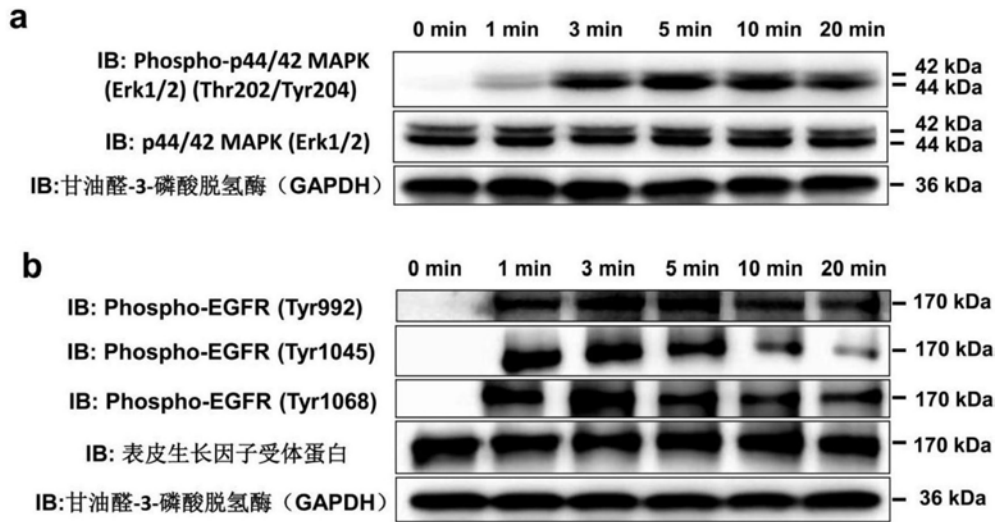


图7

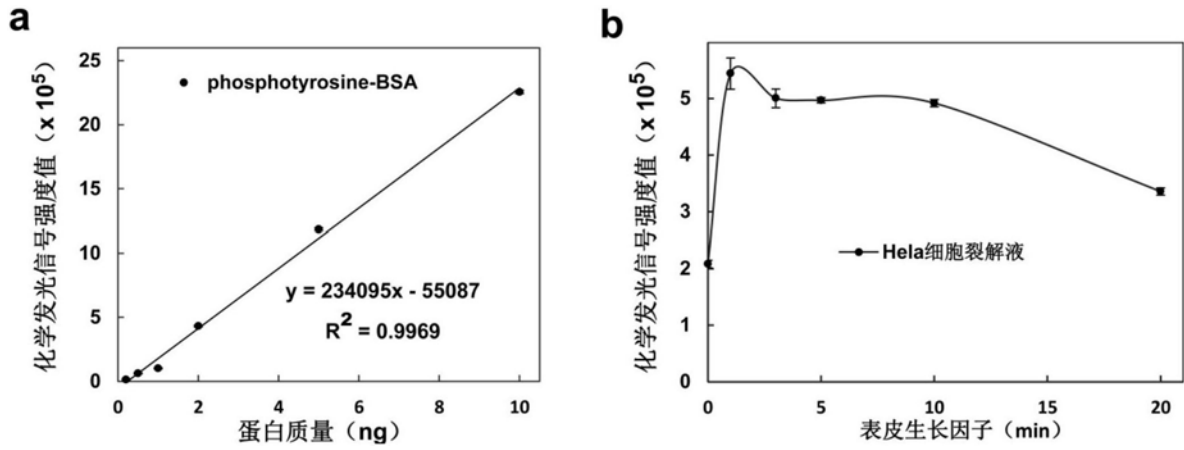


图8

专利名称(译)	一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法		
公开(公告)号	CN108693348A	公开(公告)日	2018-10-23
申请号	CN201710231387.5	申请日	2017-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院大连化学物理研究所		
[标]发明人	叶明亮 李亚楠		
发明人	叶明亮 李亚楠		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/54306		
代理人(译)	马驰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种酪氨酸磷酸化蛋白质定量分析方法，该方法是以经过修饰的SH2超亲体为一抗，基于ELISA法，得到待测样品中酪氨酸磷酸化水平的动态变化曲线，检测过程中，以酪氨酸磷酸化标准蛋白为参照样品得到标准曲线，以标准曲线为参照，实现待测样品中酪氨酸磷酸化水平定量分析；该方法成本低、无需样品预富集、特异性好、检测限低。此外，ELISA法在孔板中进行，仪器简单。所采用的SH2超亲体可通过细菌表达、纯化得到大量结构稳定的蛋白，大大节约了实验成本，背景清楚，方便改造。其对酪氨酸磷酸化蛋白具有和抗体一样的高亲和高特异性且相对广谱的特点，成功实现对多个复杂样品的酪氨酸磷酸化水平定量分析。

