

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510041143.8

[43] 公开日 2006年2月1日

[11] 公开号 CN 1727896A

[22] 申请日 2005.7.22

[21] 申请号 200510041143.8

[71] 申请人 南京川博生物技术有限公司

地址 210061 江苏省南京市高新技术产业开发区生物医药大楼 A 座 301 室

[72] 发明人 彭早元 张 薇 林世康 胡云龙

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所

代理人 栗仲平

权利要求书 6 页 说明书 25 页

[54] 发明名称

磷酸化及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用及其制备方法

[57] 摘要

抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，多克隆抗体是指：以一端带半胱氨酸的含有磷酸化氨基酸的多肽为半抗原，用碘基琥珀酰亚胺 4 - [N 甲基马来酸] - 1 - 羧环己烷做偶联剂与钥孔血蓝蛋白连接成半抗原 - 载体蛋白系统，经免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，血清经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。该多克隆抗体的制备方法是：合成多肽、用偶联剂与钥孔血蓝蛋白连接成半抗原 - 载体蛋白系统、经免疫程序免疫兔子后取血分离血清，经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。

1、抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体是指：以一端带半胱氨酸的，长度为13-15个氨基酸的，其中含有磷酸化氨基酸的多肽为半抗原，用磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷做偶联剂，与钥孔噉血蓝蛋白连接成半抗原-载体蛋白系统，经免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，血清经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。

2、按照权利要求1所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，其特征在于，所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体为：分别选择目标蛋白的氨基酸序列中，其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的氨基酸两侧的氨基酸序列，设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N端或C端天然带有或人为添加一个半胱氨酸，其中一条多肽链上至少包含一个相当于上述特定磷酸化位点的氨基酸为磷酸化氨基酸；相应制备的抗体分别为抗上述不同位点氨基酸磷酸化的蛋白的多克隆抗体。

3、按照权利要求1或2所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，其特征在于，所述的抗体作为疾病诊断试剂的具体应用方法是：

使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的酶联免疫检测方法，包括间接法和双抗体夹心法，均是通过 ELISA 方法检测人细胞裂解液中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度，即能够达到准确诊断某些疾病的目的；

使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的免疫组织化学方法是指用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体通过 IHC 方法检测人实体肿瘤石蜡切片中疾病相关蛋白磷酸化状态和程度，达到准确诊断某些疾病的目的；

使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的免疫印迹法是使用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体通过检测人细胞裂解液中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度，达到准确诊断某些疾病的目的。

4、一种权利要求 1 所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

分别选择目标蛋白的氨基酸序列中，其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的氨基酸两侧的氨基酸序列，设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N 端或 C 端天然带有或人为添加一个半胱氨酸，其中一条多肽链上至少包含一个相当于所述特定磷酸化位点的氨基酸为磷酸化氨基酸，以该多肽为半抗原，用磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷做偶联剂，与钥孔喊血蓝蛋白连接成半抗原-载体蛋白系统，经免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。

5、按照权利要求 4 所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法，其特征在于，具体步骤是：

合成多肽：根据目标蛋白的氨基酸序列，选择其磷酸化状态和程度与蛋

白质功能相关联的位点的氨基酸两侧的氨基酸序列，分别设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N端或C端天然带有或人为添加一个半胱氨酸，其中一条多肽链上，至少包括一个相当于上述特定位点的氨基酸为磷酸化氨基酸；

用双功能偶联剂磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷作为偶联剂，与钥孔噉血蓝蛋白上游离氨基反应，使之活化，然后用 G25 脱盐柱去除未偶联的 SMCC，收集蛋白峰即为活化的 KLH；

KLH - SMCC 与多肽通过 Cys 上的巯基连接，构成适合用于免疫动物的多肽 - KLH 抗原系统；

按每只兔子 300 μ g 多肽 - KLH 的剂量对兔子实行基础免疫，基础免疫后第 21 天进行第一次加强免疫，以后每隔 21 天进行一次加强免疫，在第四次加强免疫完成后 7 天根据 ELISA 检测结果，收集达到采血标准的阳性血清；

制备亲和层析用抗原柱：选用已活化好的 Sulfolink Gel，按 2ml 胶偶联 2mg 多肽的比例将两者混合，用半胱氨酸封闭多余活化位点，将偶联好的胶装填在空层析柱中，用交联缓冲液洗柱；

亲和层析：将阳性血清过滤，并调整 PH，已制备好的磷酸化多肽层析柱用 PBS 洗柱，然后取出与血清混合，将血清和胶的混合物重新装入层析柱中，收集穿透液，然后用 PH2.8 的甘氨酸对结合了抗体的柱子进行洗脱，洗脱液迅速用 PH7.6 的 Tris-HCl 中和，测定洗脱液在波长 280nm 处的光吸收值： OD_{280} ，收集 $OD_{280}0.15$ 以上的洗脱液，该洗脱液内含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体及非磷酸化蛋白多克隆抗体，将洗脱液与制备好的非磷酸化多肽层析胶反应，从非磷酸化多肽层析柱穿透出来的液体即含抗特定位点

丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体, 从非磷酸化多肽层析柱洗脱下来的液体即为相对应抗原表位的非磷酸化蛋白多克隆抗体。

6、按照权利要求 4 或 5 所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法, 其特征在于, 具体步骤是:

合成多肽: 根据在 Swiss-Prot 站点中查得的目标蛋白的氨基酸序列, 选择其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的位点的氨基酸两侧的氨基酸序列, 分别设计并人工合成数对多肽, 每对多肽序列相同, N 端或 C 端天然带有或人为添加一个半胱氨酸——Cys, 其中一条多肽链上, 至少包括一个相当于上述特定位点的氨基酸为磷酸化氨基酸;

用双功能偶联剂磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷作为偶联剂, 与钥孔噉血蓝蛋白上游离氨基反应, 使之活化, 钥孔噉血蓝蛋白与磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷的质量比为 4/1, 然后用 G25 脱盐柱去除未偶联的磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷, 收集蛋白峰即为活化的钥孔噉血蓝蛋白——钥孔噉血蓝蛋白—磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷;

钥孔噉血蓝蛋白—磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷与多肽通过 Cys 上的巯基连接, 构成适合用于免疫动物的多肽—钥孔噉血蓝蛋白抗原系统, 偶联的具体步骤为: 合成多肽溶于纯水中, 然后与活化好的钥孔噉血蓝蛋白—磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷混合, 两者的质量比为 1: 1, 该混合物 4℃缓慢搅拌过夜, 然后用 2 倍于多肽量的半胱氨酸封闭钥孔噉血蓝蛋白上的多余活化位点, 封闭条件为 4℃2 小时, 封闭结束后, 钥孔噉血蓝蛋白—多肽用 10mMPBS 透析, 去除游离的多肽和半胱氨酸, 即

成偶联好的抗原，该抗原在 -70°C 保存；

按每只兔子 $300\mu\text{g}$ 钥孔噻血蓝蛋白 - 多肽的剂量对兔子实行基础免疫，取规定剂量的钥孔噻血蓝蛋白 - 多肽用 10mMPBS 稀释至 1ml ，与 1ml 完全福氏佐剂混合，用双联注射器反复推拉，制成乳化剂，免疫途径为皮下多点，基础免疫后第 21 天进行第一次加强免疫，加强免疫使用的抗原剂量为 $200\mu\text{g}$ ，抗原液体积仍为 1ml ，佐剂改用 1ml 不完全福氏佐剂，以后每隔 21 天进行一次加强免疫，期间采血分离血清，用 BSA 偶联的多肽做检测抗原，进行 ELISA 检测，在第四次加强免疫完成后 7 天根据 ELISA 检测结果，收集达到采血标准的阳性血清；

制备亲和层析用抗原柱：选用已活化好的 Sulfolink 胶，按 2ml 胶偶联 2mg 多肽的比例将两者混合， 4°C 缓慢搅拌过夜，然后用半胱氨酸封闭多余活化位点，封闭完成后，将偶联好的胶装填在空层析柱中，用交联缓冲液洗柱，最后用含 0.05% 叠氮钠的保存液保存偶联好的柱子，保存条件为 4°C ，磷酸化多肽和非磷酸化多肽各偶联一根柱子；

亲和层析：将阳性血清用 $0.45\mu\text{m}$ 的滤器过滤，并用 $\text{PH}7.6$ 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液调整血清的 PH ，三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液的使用量为血清量的 10% ，已制备好的磷酸化多肽层析柱用 10mM 磷酸缓冲生理盐水洗柱，然后取出与血清混合， 4°C 缓慢搅拌过夜，第二天将血清和胶的混合物重新装入层析柱中，收集穿透液，然后用 $\text{PH}2.8$ 的甘氨酸对结合了抗体的柱子进行洗脱，洗脱液迅速用 $\text{PH}7.6$ 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液中和，测定洗脱液在波长 280nm 处的光吸收值 OD_{280} ，收集 $\text{OD}_{280}0.15$ 以上的洗脱液，该洗脱液内含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体及非磷酸化蛋白多克

隆抗体，将洗脱液与制备好的非磷酸化多肽层析胶反应，反应条件与洗脱方法同磷酸化多肽层析柱，从非磷酸化多肽层析柱穿透出来的液体即含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体，从非磷酸化多肽层析柱洗脱下来的液体即为相对应抗原表位的非磷酸化蛋白多克隆抗体；

两种抗体经透析和浓缩后，加入 50% 甘油，即成为抗体试剂成品。

磷酸化及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体
在制备疾病诊断试剂中的应用及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种蛋白质多克隆抗体的新用途及其制备方法，具体涉及一种抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用及其制备方法。本发明的抗体制备方法，实际是一种可以应用于疾病诊断的试剂的制备方法，这些疾病包括与蛋白质磷酸化状态和程度相关联疾病，如肿瘤、神经系统疾病、老年病等，诊断手段包括酶联免疫测定法（ELISA）、免疫印迹测定法（Western Blot）和免疫组织化学（IHC）。

背景技术

当前利用免疫方法来诊断疾病的方法，一般都是通过检测病变细胞分泌不同于正常细胞的特异性蛋白或某种分泌明显增加或减少的特征蛋白，来区分正常细胞和病变细胞，对于那些仅仅出现蛋白质分子修饰的改变（如可逆性磷酸化）而无蛋白质表达量改变的疾病，现行方法是不能检测的，而许多信号转导通路相关的疾病的发生机理，就是因为发生蛋白质修饰的改变，根据目前的研究结果，已能证明很多疾病在某些蛋白的几个特定位点磷酸化程度明显增强或减弱。这就提示我们能够利用抗这种蛋白的几个特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体，通过检测该蛋白几个特定位点的磷酸化状态和程度来区分病变细胞与正常细胞，从而达到诊断疾病的目的。但是目前的现有技术中

没有这种诊断疾病的试剂和方法。

具体地说：蛋白质的大多数调控机制是通过蛋白质的构象变化介导的，而构象发生变化常常是通过变构效应和蛋白质一级结构上发生的各种共价修饰来实现的。其中，磷酸化是最常见、最重要的共价修饰方式。蛋白质加上或者切除一个或多个磷酸基，不但会改变它的立体构象，并且会改变它的表面电荷，从而改变它的功能或表现出其它的功能。可以说，蛋白质的磷酸化与脱磷酸化是细胞内普遍存在的一种共价修饰的生理调节方式，几乎涉及所有的生理及病理过程，如代谢、生长发育、神经递质的合成与释放、甚至癌变等。

最早关于蛋白质磷酸化可以调节酶活性的报道是在 1955 年 (Fischer and Krebs)，但蛋白质磷酸化在调节细胞生理上的重要性直到二十几年后才得到重视，目前，蛋白质的可逆磷酸化在控制细胞对胞外刺激的反应过程中的重要作用已经得到广泛的认知，而且细胞的生长、发育、分化及许多其他受到信号转导调控的生理学反应大多都建立在蛋白质可逆磷酸化的基础之上。细胞信号转导的各个系统中，一个共同的环节就是由蛋白激酶和蛋白磷酸酶催化的蛋白质可逆磷酸化反应，它对于信号的快速、精确传递起着无可替代的作用。

随着生命科学和医学研究的发展，人们已认识到许多疾病的发生发展与细胞信号转导的阻滞或错误等异常情况有密切的关系。如保罗·格林加德发现，蛋白质磷酸化可影响神经细胞内具有不同功能的一系列蛋白质。其中一些蛋白组成了细胞膜上的离子通道。当某一特定的离子通道被磷酸化时，这一神经细胞的功能也就发生改变，譬如兴奋性的改变。(Greengard P.

Phosphorylated proteins as physiological effectors. Science. 1978, 199(4325): 146-52.) 保罗·格林加德由于此项研究与其他两位两位研究神经细胞信号转导的科学家一起分享了 2000 年诺贝尔生理学或医学奖。

近期研究表明:细胞周期蛋白依赖性激酶功能失调与阿尔茨海默病的 tau 蛋白的异常磷酸化和细胞的异常 APP 代谢有关,其在阿尔茨海默病的发病过程中可能发挥重要作用。

细胞癌变最基本的特征是生长失控及分化异常。近年来人们认识到绝大多数的癌基因表达产物都是细胞信号转导系统的组成成分,它们可以从多个环节干扰细胞信号转导过程,导致肿瘤细胞增殖与分化异常。某些癌基因可通过编码非受体 TPK 或丝/苏氨酸激酶类影响细胞信号转导过程。例如 src 癌基因产物具有较高的 TPK 活性,可催化下游信号转导分子的酪氨酸磷酸化,促进细胞异常增殖。

Rb 基因是最早发现的肿瘤抑制基因,定位于核内,有磷酸化和非磷酸化两种形式,非磷酸化形式称活性型,能促进细胞分化,抑制细胞增殖。处于分裂增殖的肿瘤细胞只含有磷酸化型的 Rb 蛋白。说明 Rb 蛋白的磷酸化修饰作用对细胞生长、分化起着重要的调节作用。Rb 基因对肿瘤的抑制作用与转录因子(E-2F)有关。E-2F 是一类激活转录作用的活性蛋白,低磷酸化型的 Rb 蛋白与 E-2F 结合成复合物,使 E-2F 处于非活化状态; Rb 蛋白被磷酸化后与 E-2F 解离, E-2F 变成游离状态,于是细胞增殖活跃,导致肿瘤发生。

杨志芳等研究抑癌基因 PTEN 发现,PTEN 可依赖其磷酸酶活性抑制 FAK 和 Akt 的磷酸化,并诱导肝癌细胞发生失巢凋亡。(杨志芳等.PTEN 依赖其磷酸酶活性诱导肝癌细胞发生失巢凋亡机制的探讨。中华肿瘤杂志2005, 27

(5))。

朱吉莉等研究发现, AKT的磷酸化具有明显的 Ang II 浓度依赖性, 随 Ang II 浓度的增加而逐渐受到抑制, 并与细胞凋亡指数呈显著负相关 ($r=0.90$, $P < 0.01$)。由此认为 Ang II 可以诱导肾小管上皮细胞凋亡并抑制细胞的增殖, 可能部分是通过抑制 PI3K-AKT 信号传导途径实现的 (朱吉莉等: 血管紧张素 II 通过抑制 AKT/蛋白激酶 B 磷酸化诱导肾小管上皮细胞凋亡。中华肾脏病杂志 2005, 21 (3))。

傅志超等的研究表明, 在 γ 射线诱发的小鼠白血病骨髓细胞中, 癌变组骨髓细胞中 P44/42MAPK 蛋白及磷酸化水平均高于辐射未癌变组和对照组。

(傅志超等: P44/42MAPK 和 STAT3 在 γ 射线诱发的小鼠白血病骨髓细胞中的表达。生物化学与生物物理进展 2003, 30 (2): 199 - 203)。

以上研究证明, 细胞内蛋白质一些特定位点的磷酸化程度和状态与许多疾病相关, 由此我们认为利用抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体, 通过检测组织或细胞中某些蛋白质特定位点的磷酸化程度和状态, 能够达到准确诊断某些疾病的目的。

抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体是基于细胞信号转导领域研究飞速发展的需要而开发出来的新型研究工具, 具有特异性好, 操作简捷可靠, 结果容易判定, 应用方式多样等特点, 目前在信号转导基础研究领域已得到广泛应用, 人们通过这类抗体可以直接检测组织或细胞中目标蛋白的磷酸化状态和程度, 从而可以比较病变细胞与正常细胞的区别, 达到揭示疾病发生机理的目的。

传统的磷酸化蛋白质的分析是利用体外激酶反应使蛋白质被磷酸化修

饰，产生足够用于分析的磷酸化蛋白，经化学或质谱分析确定磷酸化位点，例如 Edman 测序和串联质谱测序。此法虽然证明了特定的磷酸化位点体外研究的生物学意义，但必须证实体内情况下，发生功能作用的磷酸化位点与其相同。这一点，通常通过比较磷酸化蛋白质的二维磷酸肽图得以证实，如果体内和体外磷酸肽在二维图谱中共迁移，则可认为磷酸化位点相同。这个方法不能直接分析出体内蛋白质磷酸化情况，且比较烦琐，成本高，不可能普及应用于疾病诊断。因此，在抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体开发出来以前，几乎不可能通过临床检测患者的蛋白磷酸化状态和程度来诊断疾病。

通过放射性同位素标记鉴定磷酸化位点也是研究磷酸化蛋白的传统方法，但很难在组织样品中应用，且放射性同位素对操作人员的健康和环境都是有害的。虽然现在已经用非同位素来代替放射性同位素做标记，但这种方法一次只能分析一个目的蛋白，也不适应医院临床诊断。

另外，抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体应用于磷酸化蛋白研究仅仅几年，还未见用于临床诊断，主要因为目前能规模化生产的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白抗体种类还不多，很多理论上能用于疾病诊断的抗体的产量很低，仅能提供研究用。

发明内容

本发明的目的是提供一种抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用方法，以及这种抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法。利用本发明可以进行诊断的疾病包括与蛋白质磷酸化状态和程度相关联疾病，如肿瘤、神经系统疾病、老年病等多种与细胞信号转导

异常相关的疾病；诊断手段包括酶联免疫测定法（ELISA）、免疫印迹测定法（Western Blot）和免疫组织化学（IHC）。

完成上述发明任务的技术方案是：

抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体是指：以一端带半胱氨酸（Cys）的，长度为13-15个氨基酸的，其中含有磷酸化氨基酸的多肽为半抗原，用磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷（Sul-SMCC）做偶联剂，与钥孔血蓝蛋白（KLH）连接成半抗原-载体蛋白系统，经一定免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，血清经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。

以上方案的进一步细化，所述的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体为：分别选择目标蛋白的氨基酸序列中，其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的氨基酸两侧的氨基酸序列，设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N端或C端天然带有或人为添加一个半胱氨酸（Cys），其中一条多肽链上至少包含一个相当于上述特定磷酸化位点的氨基酸为磷酸化氨基酸。也就是说，以上方案中也包括在一条合成多肽同时包含2个或2个以上位点的磷酸化氨基酸的情况；相应制备的抗体分别为抗上述不同位点氨基酸磷酸化的蛋白的多克隆抗体。

以上方案中所述的多肽的长度（氨基酸的数量），对其作为抗原的活性没有明显影响，所以，在满足上述限定特征的多肽上增加或减少一个或几个氨基酸所构成的多肽，均应视为本方案的等同替代方案。本申请推荐采用13~15

肽，特别是 14 肽。

其作为疾病诊断试剂的具体应用方法是：

1、使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的酶联免疫检测（ELISA）方法，包括间接法和双抗体夹心法，均是通过 ELISA 方法检测人细胞裂解液（人组织裂解液）中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度，即能够达到准确诊断某些疾病的目的。

2、使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的免疫组织化学方法（Immunohistochemistry，IHC）是指用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体通过 IHC 方法检测人实体肿瘤石蜡切片中疾病相关蛋白磷酸化状态和程度，达到准确诊断某些疾病的目的。

3、使用抗特定位点磷酸化蛋白抗体的免疫印迹法（Western Blot）是使用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体通过检测人细胞裂解液（组织裂解液）中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度，达到准确诊断某些疾病的目的。

抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法，包括以下步骤：

分别选择目标蛋白的氨基酸序列中，其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的氨基酸两侧的氨基酸序列，设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N 端或 C 端天然带有或人为添加一个半胱氨酸（Cys），其中多肽链上包含一个相当于上述特定磷酸化位点的氨基酸为磷酸化氨基酸，以该多肽为半抗原，用磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷（Sul-SMCC）做偶联剂，与钥孔噻血蓝蛋白（KLH）连接成半抗原-载体蛋白系统，经一定免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定

位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。

以上所述的“经一定免疫程序免疫兔子”可以采用现有技术中的常规动物免疫程序，例如：采用本申请实施例中推荐的程序。

更具体和更优化地说，本发明中抗特定定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体的制备方法的步骤是：

1、合成多肽：根据目标蛋白的氨基酸序列，选择其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的位点的氨基酸两侧的氨基酸序列，分别设计并人工合成数对多肽，每对多肽序列相同，N端或C端天然带有或人为添加一个半胱氨酸（Cys），其中一条多肽链上，至少包括一个相当于上述特定定位点的氨基酸为磷酸化氨基酸；

2、用双功能偶联剂磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷（Sulfo-SMCC）作为偶联剂，与钥孔喊血蓝蛋白（KLH）上游离氨基反应，使之活化，然后用 G25 脱盐柱去除未偶联的 SMCC，收集蛋白峰即为活化的 KLH（即 KLH-SMCC）；

3、KLH-SMCC 与多肽通过 Cys 上的巯基连接，构成适合用于免疫动物的多肽-KLH 抗原系统。

4、按每只兔子 300 μ g 多肽-KLH 的剂量对兔子实行基础免疫，基础免疫后第 21 天进行第一次加强免疫，以后每隔 21 天进行一次加强免疫，在第四次加强免疫完成后 7 天根据 ELISA 检测结果，收集达到采血标准的阳性血清；

5、制备亲和层析用抗原柱：选用已活化好的 Sulfolink Gel，按 2ml 胶偶联 2mg 多肽的比例将两者混合，用半胱氨酸（Cys）封闭多余活化位点，将

偶联好的胶装填在空层析柱中，用交联缓冲液洗柱；

6、亲和层析：将阳性血清过滤，并调整 PH，已制备好的磷酸化多肽层析柱用 PBS 洗柱，然后取出与血清混合，将血清和胶的混合物重新装入层析柱中，收集穿透液，然后用 PH2.8 的甘氨酸对结合了抗体的柱子进行洗脱，洗脱液迅速用 PH7.6 的 Tris-HCl 中和，测定洗脱液在波长 280nm 处的光吸收值 (OD_{280})，收集 $OD_{280}0.15$ 以上的洗脱液，该洗脱液内含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体及非磷酸化蛋白多克隆抗体，将洗脱液与制备好的非磷酸化多肽层析胶反应，从非磷酸化多肽层析柱穿透出来的液体即含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体，从非磷酸化多肽层析柱洗脱下来的液体即为相对应抗原表位的非磷酸化蛋白多克隆抗体。

本申请推荐以下优化的具体操作方案：

1、合成多肽：根据在 Swiss-Prot 站点中查得的目标蛋白的氨基酸序列，选择其磷酸化状态和程度与蛋白质功能相关联的位点的氨基酸两侧的氨基酸序列，分别设计并人工合成数对多肽。每对多肽序列相同，N 端或 C 端天然带有或人为添加一个半胱氨酸 (Cys)，其中一条多肽链上，至少包括一个相当于上述特定位点的氨基酸为磷酸化氨基酸；

2、用双功能偶联剂磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷 (Sulfo-SMCC) 作为偶联剂，与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 上游离氨基反应，使之活化，KLH 与 Sulfo-SMCC 的质量比为 4/1，然后用 G25 脱盐柱去除未偶联的 SMCC，收集蛋白峰即为活化的 KLH (即 KLH-SMCC)；

3、KLH-SMCC 与多肽通过 Cys 上的巯基连接，构成适合用于免疫动物的多肽-KLH 抗原系统。偶联的具体步骤为：合成多肽溶于纯水中，然后与

活化好的 KLH 混合，两者的质量比为 1:1，该混合物 4℃缓慢搅拌过夜，然后用 2 倍于多肽量的半胱氨酸（Cys）封闭 KLH 上的多余活化位点，封闭条件为 4℃2 小时，封闭结束后，多肽-KLH 用 10mMPBS 透析，去除游离的多肽和半胱氨酸，即成偶联好的抗原，该抗原在 -70℃保存；

4、按每只兔子 300μg 多肽-KLH 的剂量对兔子实行基础免疫，取规定剂量的 KLH-多肽用 10mMPBS 稀释至 1ml，与 1ml 完全福氏佐剂混合，用双联注射器反复推拉，制成乳化剂，免疫途径为皮下多点。基础免疫后第 21 天进行第一次加强免疫，加强免疫使用的抗原剂量为 200μg，抗原液体积仍为 1ml，佐剂改用 1ml 不完全福氏佐剂，以后每隔 21 天进行一次加强免疫，期间采血分离血清，用 BSA 偶联的多肽做检测抗原，进行 ELISA 检测，在第四次加强免疫完成后 7 天根据 ELISA 检测结果，收集达到采血标准的阳性血清；

5、制备亲和层析用抗原柱：选用已活化好的 Sulfolink Gel，按 2ml 胶偶联 2mg 多肽的比例将两者混合，4℃缓慢搅拌过夜，然后用半胱氨酸（Cys）封闭多余活化位点，封闭完成后，将偶联好的胶装填在空层析柱中，用交联缓冲液洗柱，最后用含 0.05% 叠氮钠的保存液保存偶联好的柱子，保存条件为 4℃，磷酸化多肽和非磷酸化多肽各偶联一根柱子；

6、亲和层析：将阳性血清用 0.45μm 的滤器过滤，并用 PH7.6 的 Tris-HCl 调整血清的 PH，Tris-HCl 的使用量为血清量的 10%，已制备好的磷酸化多肽层析柱用 10mM PBS（磷酸缓冲生理盐水洗柱），然后取出与血清混合，4℃缓慢搅拌过夜，第二天将血清和胶的混合物重新装入层析柱中，收集穿透液，然后用 PH2.8 的甘氨酸对结合了抗体的柱子进行洗脱，洗脱液迅速用 PH7.6

的 Tris-HCl 中和，测定洗脱液在波长 280nm 处的光吸收值 (OD_{280})，收集 $OD_{280}0.15$ 以上的洗脱液，该洗脱液内含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体及非磷酸化蛋白多克隆抗体，将洗脱液与制备好的非磷酸化多肽层析胶反应，反应条件与洗脱方法同磷酸化多肽层析柱，从非磷酸化多肽层析柱穿透出来的液体即含抗特定位点丝氨酸磷酸化蛋白多克隆抗体，从非磷酸化多肽层析柱洗脱下来的液体即为相对应抗原表位的非磷酸化蛋白多克隆抗体。

7、两种抗体经透析和浓缩后，加入 50% 甘油，即成为抗体试剂成品。

特异性抗磷酸蛋白的抗体，可以通过酶联测试，免疫印记，荧光免疫，病理切片等手段，用于检测病变的细胞如癌变细胞与正常细胞的区别，是蛋白质研究、细胞信号转导研究、细胞病变研究、重大疾病诊断和新药筛选的十分重要的工具。

本发明提供的抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断药物的试剂或药物中的应用，为临床疾病的诊断提供了新的工具。这些可被诊断的疾病包括与蛋白质磷酸化状态和程度相关联疾病，如肿瘤、神经系统疾病、老年病等，诊断手段包括酶联免疫测定法 (ELISA)、免疫印迹测定法 (Western Blot) 和免疫组织化学 (IHC)。本发明提供的制备方法，能大量生产出抗这些与疾病相关磷酸化位点的蛋白的纯化抗体，这些抗体适用于 ELISA、Western Blot、IHC 等常规免疫诊断的方法，且成本很低。

具体实施方式

实施例 1:

多克隆抗体制备方法:

1、合成多肽：根据在 Swiss-Prot 站点中查得 c-Jun 的氨基酸序列，选择 73 位点丝氨酸附近的序列，设计并人工合成两条 14 肽，这两条多肽序列相同，多肽链的 N 端或 C 端增加一个 Cys，其中一条多肽链 N 端计算第 7 位（相当于 c-Jun 的第 73 位点）的丝氨酸为磷酸化氨基酸。

2、用双功能偶联剂磺基琥珀酰亚胺 4-[N 甲基马来酸]-1-羧环己烷（Sulfo-SMCC）作为偶联剂，与钥孔血蓝蛋白（KLH）上游离氨基反应，使之活化。具体方法是将 KLH 复溶在双蒸水中，加入 Sulfo-SMCC（质量比：KLH/SMCC 为 4/1），室温缓慢搅拌 60 分钟，然后用 G25 脱盐柱去除未偶联的 SMCC，收集蛋白峰即为活化的 KLH（KLH-SMCC），经测定活化得率在 85% 以上。

3、KLH-SMCC 与多肽通过 Cys 上的巯基连接，构成适合用于免疫动物的多肽-KLH 抗原系统。具体方法是将合成多肽溶于纯水中，然后与活化好的 KLH 混合，两者的质量比为 1: 1，该混合物 4℃ 缓慢搅拌过夜，然后用 2 倍于多肽量的半胱氨酸（Cys）封闭 KLH 上的多余活化位点，封闭条件为 4℃ 2 小时。封闭结束后，多肽-KLH 用 10mMPBS 透析，去除游离的多肽和半胱氨酸。偶联好的抗原在 -70℃ 保存。

4、按每只兔子 300μg 多肽-KLH 的剂量对兔子实行基础免疫，具体方法是取规定剂量的多肽-KLH 用 10mMPBS 稀释至 1ml，与 1ml 完全福氏佐剂混合，用双联注射器反复推拉，制成乳化剂，对兔子进行基础免疫，免疫途径为皮下多点。基础免疫后第 21 天进行第一次加强免疫，加强免疫使用的抗原剂量为 200μg，抗原液体积仍为 1ml，佐剂改用 1ml 不完全福氏佐剂，免疫途径为皮下多点和肌肉。以后每隔 21 天进行一次加强免疫，期间采血分离

血清，用 BSA 偶联的多肽做检测抗原，进行 ELISA 检测。在第四次加强免疫完成后 7 天根据 ELISA 检测结果，收集达到采血标准的阳性血清。按照上述方法，四次加强免疫完成后，兔子的血清滴度均达到 1: 64000 以上，免疫效果极佳。

5、制备亲和层析用抗原柱：选用已活化好的 Sulfolink Gel，按 2ml 胶偶联 2mg 多肽的比例将两者混合，4℃缓慢搅拌过夜，然后用半胱氨酸（Cys）封闭多余活化位点，封闭完成后，将偶联好的胶装填在空层析柱中，用交联缓冲液洗柱，最后用含 0.05% 叠氮钠的保存液保存偶联好的柱子，保存条件为 4℃。磷酸化多肽和非磷酸化多肽各偶联一根柱子。

6、亲和层析：将阳性血清用 0.45 μ m 的滤器过滤，并用 PH7.6 的 Tris-HCl（三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液）调整血清的 PH，Tris-HCl 的使用量为血清量的 10%。已制备好的磷酸化多肽层析柱用 10mM PBS 洗柱，然后取出与血清混合，4℃缓慢搅拌过夜，第二天将血清和胶的混合物重新装入层析柱中，收集穿透液，然后用 PH2.8 的甘氨酸对结合了抗体的柱子进行洗脱，洗脱液迅速用 PH7.6 的 Tris-HCl 中和，测定洗脱液在波长 280nm 处的光吸收值（OD₂₈₀），收集 OD₂₈₀0.15 以上的洗脱液，该洗脱液内含抗第 73 位点丝氨酸磷酸化 c-Jun 蛋白多克隆抗体及非磷酸化 c-Jun 蛋白多克隆抗体，将洗脱液与制备好的非磷酸化多肽层析胶反应，反应条件与洗脱方法同磷酸化多肽层析柱，从非磷酸化多肽层析柱穿透出来的液体即为含抗第 73 位点丝氨酸磷酸化 c-Jun 蛋白多克隆抗体及非磷酸化 c-Jun 蛋白（67 - 79）多克隆抗体，从非磷酸化多肽层析柱洗脱下来的液体即为相对应抗原表位的非磷酸化 c-Jun 蛋白多克隆抗体。

7、两种抗体经透析和浓缩后，加入 50% 甘油，即成为抗体试剂成品。

本实施例中描述的使用抗特定位点磷酸化蛋白多克隆抗体的酶联免疫检测 (ELISA) 共有二种，即间接法和双抗体夹心法，均是通过 ELISA 方法检测人细胞裂解液 (人组织裂解液) 中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度。

1、间接 ELISA 法：人肿瘤细胞裂解液包被 96 孔酶标板，这些肿瘤包括乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、白血病、胃癌、前列腺癌、肝癌，同时以人正常细胞裂解液做对照，包被浓度 5 μ g/孔，包被液为 PH9.6 的碳酸钠溶液，包被条件为 4 $^{\circ}$ C 过夜。第二天取出后，用含 0.1% 的 PBS 洗涤三次，以 5% 脱脂奶粉封闭多余位点，封闭条件为 37 $^{\circ}$ C 1.5 小时，封闭完成后洗涤三次，加入抗特定位点磷酸化蛋白的兔多克隆抗体，37 $^{\circ}$ C 反应 1.5 小时，洗涤三次后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，洗涤三次，最后加入 TMB 底物，反应 20 分钟后以 2N 硫酸中止反应，在酶标仪上读取 450nm 处的 OD 值。结果表明抗特定位点磷酸化蛋白的兔多克隆抗体对以上肿瘤细胞裂解液均有不同程度的反应，而对正常细胞裂解液反应较弱。

2、双抗体夹心法：用抗某个抗原表位的纯化非磷酸化蛋白兔多克隆抗体包被酶标板，包被浓度 1 μ g/孔，包被液为 PH7.4 的 PBS，包被条件为 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤封闭同 ELISA 间接法。然后加入肿瘤细胞裂解液 (或组织裂解液)，肿瘤细胞的种类同 ELISA 间接法，以正常细胞裂解液 (正常组织裂解液) 做对照，室温反应 2 小时，洗涤三次后加入生物素标记的纯化抗特定位点磷酸化蛋白的兔多克隆抗体 (该抗体与包被用抗体是针对同一蛋白分子不同抗原表位的)，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的亲和素，37 $^{\circ}$ C

反应 30 分钟，最后加入 TMB 底物，反应 20 分钟后以 2N 硫酸中止反应，在酶标仪上读取 450nm 处的 OD 值。在双抗体夹心法中，先用纯化非磷酸化蛋白兔多克隆抗体有效地捕捉裂解液中的总目标蛋白，然后用纯化抗特定位点磷酸化蛋白的兔多克隆抗体检测总蛋白中磷酸化蛋白的数量，用生物素-亲和素系统能提高灵敏度，故所得的结果 OD 值明显高于间接法，表明双抗体夹心法比间接法更适合用来检测组织或细胞裂解液中的目标蛋白及用于临床诊断。

本实施例中描述的免疫印迹法（Western Blot）是使用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体通过检测人细胞裂解液（组织裂解液）中某一或几种蛋白的磷酸化状态和程度。

1、用常规方法制备 SDS - PAGE 胶，本实验中选用 10% 分离胶和 5% 的分离胶，胶制备完成后，将各种细胞裂解液分别加入 $2 \times$ SDS 样品缓冲液， 100°C 煮沸 5 分钟，然后将肿瘤细胞裂解液和正常细胞裂解液分别加入各泳道，100V 恒压跑浓缩胶，120V 恒压跑分离胶。

2、SDS - PAGE 结束后，用常规方法将蛋白转到硝酸纤维膜上，转膜采用 100mA 恒流，在冷环境下转膜 2 小时。转膜后用 5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜。

3、封闭完成的膜按泳道切成小条，与抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体反应， 37°C 1 小时，洗涤后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG， 37°C 1 小时，洗涤后加入底物显色。

实验结果表明：针对同一蛋白，不同肿瘤细胞的磷酸化程度不一样，但大都高于正常细胞，因此，抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体，通过免

疫印迹法检测人肿瘤细胞裂解液中疾病相关蛋白的磷酸化状态或程度用于临床诊断是可行的。

本实施例中描述的免疫组织化学方法 (Immunohistochemistry, IHC) 是指用抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体, 通过 IHC 方法检测人实体肿瘤石蜡切片中疾病相关蛋白磷酸化状态和程度。

1、按常规方法对人肿瘤组织石蜡切片进行脱蜡、水化、灭活酶、抗原修复、封闭等处理, 这些肿瘤包括乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌、非小细胞肺癌、胃癌、前列腺癌、肝癌。

2、将抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体稀释到合适浓度, 滴加到切片上, 37℃, 湿盒孵育 1 小时。

3、洗涤后滴加生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃, 湿盒孵育 30 分钟。

4、洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的亲素 20ul, 37℃, 湿盒孵育 30 分钟。

5、洗涤后加入 AEC 显色试剂, 湿盒, 37℃显色 15 分钟。用蒸馏水中止显色, 然后用苏木素复染。

6、将切片组织周围的水份吸干, 在每块片子上面加入 2 滴 AEC 水性封片剂。

7、在显微镜下观察结果。

实验结果表明, 人肿瘤组织切片中肿瘤细胞部分呈阳性染色, 正常组织部分不着色或弱着色, 表明抗特定位点氨基酸磷酸化兔多克隆抗体能特异检测对应蛋白的磷酸化状态或程度, 用于某疾病相关蛋白的磷酸化状态或程度检测能用于临床诊断该疾病。

实施例 2, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条多肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的氨基酸序列中 63 丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成, 长度改为 13 个氨基酸。

实施例 3, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条多肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的 243 丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成, 长度改为 15 个氨基酸。

实施例 4, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条多肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的 91 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成, 长度改为 12 个氨基酸。

实施例 5, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条多肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的氨基酸序列中 93 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成, 长度改为 16 个氨基酸。

实施例 6, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的氨基酸序列中 239 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 7, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 根据 c-Jun 蛋白的氨基酸序列中 170 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 8, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为根据 NFkB-p65 蛋白的第 276 丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 9~12, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 NFkB-p65 蛋白的第 276、468、536 或 311 丝氨酸位点两

侧氨基酸序列设计合成。

实施例 13、14，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为分别根据 NFkB-p65 蛋白的第 254 或 435 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 15、16，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 NFkB-p100/p52 蛋白的第 865 或 869 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 17~22，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 NFkB-p105/p50 蛋白的第 337、893、907、923、927 或 932 丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 23、24，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 Rel 蛋白的第 503 丝氨酸位点，或第 475 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 25、26，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 JunB 蛋白的第 79 或 259 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 27，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 JunD 蛋白的第 255 丝氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 28~36，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 ATF-2 蛋白的第 44、94、322、349、472 或 480 丝氨酸位点，或第 51、53 或 55 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 37~41，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条

14 肽改为：分别根据 Myc 蛋白的第 62 或 373 丝氨酸位点，或第 58、358 或 400 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 42~25，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 ELK1 蛋白的第 389 或 383 的丝氨酸位点，或第 417 或 400 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 46~49，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 MEF2A 蛋白的第 355 或 408 的丝氨酸位点，或第 417 或 400 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 50~53，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 MEF2C 蛋白的第 180 或 387 的丝氨酸位点，或第 293 或 300 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 54~56，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 MEF2D 蛋白的第 180、212 或 444 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 57~63，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 GATA-1 蛋白的第 26、72、105、142、178、187 或 310 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 64，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 HNF-4 α 蛋白的第 304 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 65~71，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 IRF-3 蛋白的第 385、386、396、398、402 或 405 丝氨酸位点，或第 404 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 72、73，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 STAT-1 蛋白的第 727 丝氨酸位点，或第 701 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 74、75，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 STAT-3 蛋白的第 727 丝氨酸位点，或第 705 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 76、77，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 STAT-4 蛋白的第 721 丝氨酸位点，或第 693 酪氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 78~81，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 STAT-5A 蛋白的第 726 或 780 丝氨酸位点，或第 757 的苏氨酸位点，或第 694 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。。

实施例 82~86，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 STAT-5B 蛋白的第 730 丝氨酸位点，或第 699、679、724 或 742 酪氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 87~89，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 STAT-6 蛋白的第 756 丝氨酸位点，或第 645 苏氨酸位点，或第 641 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 90~96，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 CREB 蛋白的第 108、111、114、129、133、142 或 143 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 97、98，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条

14 肽改为：分别根据 ATF-4 蛋白的第 219 或 245 丝氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 99~101，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 c/EBP- α 蛋白的第 21 丝氨酸位点，或第 226 或 230 的苏氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 102、103，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 c/EBP- β 蛋白的第 288 丝氨酸位点或第 235 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 104，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 MyoD 蛋白的第 115 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 105，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：根据 PPARG 蛋白的第 112 的丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 106~111，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 AKT1 蛋白的第 124 或 473 丝氨酸位点，或第 308 或 450 的苏氨酸位点，或第 326 或 474 的酪氨酸位点的两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 112、113，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 AKT2 蛋白的第 474 丝氨酸位点，或第 309 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 114~117，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 AKT3 蛋白的第 120 或 472 丝氨酸位点，或第 305 或 447 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 118~121, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 PDK1 蛋白的第 241 丝氨酸位点, 或第 9、373 或 376 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 122~128, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 PTEN 蛋白的第 370、380 或 385 的丝氨酸位点, 或第 382 或 383 的苏氨酸位点, 或第 240 或 315 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 129~132, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 FOXO-3A 蛋白的第 253、315 或 644 的丝氨酸位点, 或第 32 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 133~137, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 FOXO-1A 蛋白的第 256、319、322 或 325 的丝氨酸位点, 或第 24 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 138~142, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 FOXO-4 蛋白的第 197 或 262 的丝氨酸位点、或第 451 或 455 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 143~146, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 eNOS 蛋白的第 614、632 或 1176 丝氨酸位点, 或第 494 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 147~152, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 MEK1 蛋白的第 217、221 或 297 的丝氨酸位点, 或第 285、291 或 385 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 153, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 MEK2 蛋白的第 394 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 154、155, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 GSK3 β 蛋白的第 9 丝氨酸位点, 或第 216 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 156、157, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 GSK3 α 蛋白的第 21 丝氨酸位点, 或第 279 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 158~172, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 RAF 蛋白的第 29、43、233、259、289、296、339、/338、499、621 或 642 的丝氨酸位点, 或第 269 或 491 的苏氨酸位点, 或第 340 或 341 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 173~177, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 Bcl-2 蛋白的第 70 或 87 的丝氨酸位点, 或第 56、69 或 74 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 178~180, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 Bcl-XL 蛋白的第 62 丝氨酸位点, 或第 47 或 115 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 181~187, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两条 14 肽改为: 分别根据 BAD 蛋白的第 75、99、112、118、136 或 155 丝氨酸位点, 或第 80 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 188~198, 与实施例 1 基本相同, 但有如下改变: 人工合成的两

条 14 肽改为：分别根据 ER- α 蛋白的第 102、104、106、118、154、167、236、294 或 305 的丝氨酸位点，或第 311 苏氨酸位点，或第 537 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 199~209，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：PR 蛋白的第 20、81、102、130、162、190、213、294、345、400 或 676 丝氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 210~220，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：HER2 蛋白的第 1174 丝氨酸位点，或第 686 苏氨酸位点，或第 877、1023、1112、1139、1172、1196、1221、1222 或 1248 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 221~239，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 EGFR 蛋白的第 695、768、991、1026、1070、1071、1081、1166 或 1190 丝氨酸位点，或第 678 或 693 的苏氨酸位点，或第 869、1016、1069、1092、1110、1125、1172 或 1197 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 240~247，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 VEGFR2 蛋白的第 801、951、996、1008、1054、1059、1175 或 1214 的酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 248~255，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 IGF1R 蛋白的第 973、980、1161、1165、1166、1280、1281 或 1346 酪氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 256~272，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两

条 14 肽改为：分别根据 P53 蛋白的第 6、9、15、20、33、37、46、215、315、366、376、378 或 392 丝氨酸位点，或第 18、55、81 或 387 的苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

实施例 273~283，与实施例 1 基本相同，但有如下改变：人工合成的两条 14 肽改为：分别根据 TAU 蛋白的第 199、202、214、235、262、356、396 或 404 丝氨酸位点，或第 181、205 或 231 苏氨酸位点两侧氨基酸序列设计合成。

| | | | |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 磷酸化及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1727896A | 公开(公告)日 | 2006-02-01 |
| 申请号 | CN200510041143.8 | 申请日 | 2005-07-22 |
| [标]发明人 | 彭早元 张薇 林世康 胡云龙 | | |
| 发明人 | 彭早元 张薇 林世康 胡云龙 | | |
| IPC分类号 | G01N33/531 G01N33/53 | | |
| 其他公开文献 | CN1727896B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白质多克隆抗体及对应非磷酸化蛋白质多克隆抗体在制备疾病诊断试剂中的应用，多克隆抗体是指：以一端带半胱氨酸的含有磷酸化氨基酸的多肽为半抗原，用磺基琥珀酰亚胺4-[N-甲基马来酸]-1-羧环己烷做偶联剂与钥孔血蓝蛋白连接成半抗原-载体蛋白系统，经免疫程序免疫兔子后，取血分离血清，血清经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。该多克隆抗体的制备方法是：合成多肽、用偶联剂与钥孔血蓝蛋白连接成半抗原-载体蛋白系统、经免疫程序免疫兔子后取血分离血清，经两步抗原亲和层析后纯化出抗特定位点氨基酸磷酸化蛋白和抗对应非磷酸化蛋白的多克隆抗体。