



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107988255 A

(43)申请公布日 2018.05.04

(21)申请号 201710998559.1

(22)申请日 2017.10.20

(71)申请人 深圳市龙岗区妇幼保健院

地址 518000 广东省深圳市龙岗区龙城街
道中心城爱龙路6号

(72)发明人 魏凤香 唐大木 何立智 万新红
裴元元 温丽娟 宿宁 尹爱华

(74)专利代理机构 深圳市博锐专利事务所
44275

代理人 张明

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种确定ATR与ERK结合区域的方法

(57)摘要

本发明涉及一种确定ATR与ERK结合区域的方法,本发明的有益效果在于:本发明提供的确定ATR与ERK结合区域的方法中,通过重组质粒转染细胞,并采用免疫共沉淀的方法,确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域,有利于进一步确定这些作用区域在DDR中的功能,从而为进一步阐明ERK激酶在DDR反应中的具体作用机制打下基础,对进一步理解肿瘤的发生、抗肿瘤药物的作用机制、合理用药及寻找新的作用靶点具有重要的理论意义和实用价值。

1. 一种确定ATR与ERK结合区域的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:采用HA标记ERK;

S2:采用Flag标记ATR;

S3:以HA标记的ERK和Flag标记的ATR构建第一重组质粒;

S4:将构建的第一重组质粒转染至293T细胞;

S5:使用HA和Flag标签的抗体对转染第一重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到第一ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

S7:若ERK激酶与ATR-ATRIP复合体存在结合区域,则定位ERK激酶与ATR中的结合域;

S71:以敲除N端的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第二重组质粒;

S72:以敲除FAT序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第三重组质粒;

S73:以敲除激酶区域的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第四重组质粒;

S74:以敲除FATC序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第五重组质粒;

S8:分别将第二重组质粒、第三重组质粒、第四重组质粒、第五重组质粒转染至293T细胞;

S9:使用HA和Flag标签的抗体分别对转染第二重组质粒后的293T细胞、转染第三重组质粒后的293T细胞、转染第四重组质粒后的293T细胞、转染第五重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体、第五ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

S10:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

S11:若ERK与上述ATR-ATRIP结合区域第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体中其中一个复合体存在结合区域,则可确定ATR-与ERK的结合区域。

2. 根据权利要求1所述的确定ATR与ERK结合区域的方法,其特征在于,所述S11后,还包括步骤:

根据ATR与ERK的结合区域,进一步确定该ATR与ERK的相互作用位点。

3. 根据权利要求1所述的确定ATR与ERK结合区域的方法,其特征在于,所述S1具体为:

S1:采用HA标记ERK,所述ERK包括ERK1/2和ERK1/2-kd。

4. 根据权利要求1所述的确定ATR与ERK结合区域的方法,其特征在于,所述S2具体为:

S2:采用Flag标记ATR,所述ATR包括ATR-kd。

5. 根据权利要求3所述的确定ATR与ERK结合区域的方法,其特征在于,所述S6具体为:

S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶中的激酶区域或非激酶区域与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域。

一种确定ATR与ERK结合区域的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学技术领域,特别涉及一种确定ATR与ERK结合区域的方法。

背景技术

[0002] DNA损伤反应(DDR)是真核细胞维护遗传信息传递的准确性和完整性的重要调控机制,是人体抵御恶性肿瘤的重要防御机制。当DDR发生时,ATM、ATR等蛋白激酶激活并使多种DNA损伤检控蛋白磷酸化从而启动一系列信号传递通路。本课题组最近研究发现ERK激酶在ATM与ATR反应的DNA损伤通路中起到重要的调节作用,免疫共沉淀结果发现ERK激酶与ATR蛋白存在结合区域,但具体的调控机制与结合位点尚未明确。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是:提供一种确定ATR与ERK结合区域的方法,解决ERK激酶与ATR蛋白之间的结合区域尚未明确的问题。

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种确定ATR与ERK结合区域的方法,包括以下步骤:

[0005] S1:采用HA标记ERK;

[0006] S2:采用Flag标记ATR;

[0007] S3:以HA标记的ERK和Flag标记的ATR构建第一重组质粒;

[0008] S4:将构建的第一重组质粒转染至293T细胞;

[0009] S5:使用HA和Flag标签的抗体对转染第一重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到第一ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

[0010] S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶中的激酶区域或非激酶区域与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

[0011] S7:若ERK激酶与ATR-ATRIP复合体存在结合区域,则定位ERK激酶与ATR中的结合域;

[0012] S71:以敲除N端的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第二重组质粒;

[0013] S72:以敲除FAT序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第三重组质粒;

[0014] S73:以敲除激酶区域的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第四重组质粒;

[0015] S74:以敲除FATC序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第五重组质粒;

[0016] S8:分别将第二重组质粒、第三重组质粒、第四重组质粒、第五重组质粒转染至293T细胞;

[0017] S9:使用HA和Flag标签的抗体分别对转染第二重组质粒后的293T细胞、转染第三重组质粒后的293T细胞、转染第四重组质粒后的293T细胞、转染第五重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体、第五ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀

实验结果;

[0018] S10:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

[0019] S11:若ERK与上述ATR-ATRIP结合区域第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体中其中一个复合体存在结合区域,则可确定ATR-与ERK的结合区域。

[0020] 本发明的有益效果在于:本发明提供的确定ATR与ERK结合区域的方法中,通过重组质粒转染细胞,并采用免疫共沉淀的方法,确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域,有利于进一步确定这些作用区域在DDR中的功能,从而为进一步阐明ERK激酶在DDR反应中的具体作用机制打下基础,对进一步理解肿瘤的发生、抗肿瘤药物的作用机制、合理用药及寻找新的作用靶点具有重要的理论意义和实用价值。

具体实施方式

[0021] 为详细说明本发明的技术内容、所实现目的及效果,以下结合实施方式予以说明。

[0022] 本发明最关键的构思在于:本发明通过重组质粒转染细胞,并采用免疫共沉淀的方法,确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域。

[0023] 本发明涉及一种确定ATR与ERK结合区域的方法,包括以下步骤:

[0024] S1:采用HA标记ERK;

[0025] S2:采用Flag标记ATR,所述ATR包括ATR-kd;

[0026] S3:以HA标记的ERK和Flag标记的ATR构建第一重组质粒;

[0027] S4:将构建的第一重组质粒转染至293T细胞;

[0028] S5:使用HA和Flag标签的抗体对转染第一重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到第一ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

[0029] S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

[0030] S7:若ERK激酶与ATR-ATRIP复合体存在结合区域,则定位ERK激酶与ATR中的结合域;

[0031] S71:以敲除N端的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第二重组质粒;

[0032] S72:以敲除FAT序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第三重组质粒;

[0033] S73:以敲除激酶区域的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第四重组质粒;

[0034] S74:以敲除FATC序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第五重组质粒;

[0035] S8:分别将第二重组质粒、第三重组质粒、第四重组质粒、第五重组质粒转染至293T细胞;

[0036] S9:使用HA和Flag标签的抗体分别对转染第二重组质粒后的293T细胞、转染第三重组质粒后的293T细胞、转染第四重组质粒后的293T细胞、转染第五重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体、第五ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀

实验结果；

[0037] S10:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与相应的第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域；

[0038] S11:若ERK与上述ATR-ATRIP结合区域第二ATR-ATRIP复合体、第三ATR-ATRIP复合体、第四ATR-ATRIP复合体或第五ATR-ATRIP复合体中其中一个复合体存在结合区域,则可确定ATR-与ERK的结合区域。

[0039] 上述确定ATR与ERK结合区域的方法的有益效果在于:本发明通过重组质粒转染细胞,并采用免疫共沉淀的方法,确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域,有利于进一步确定这些作用区域在DDR中的功能,从而为进一步阐明ERK激酶在DDR反应中的具体作用机制打下基础,对进一步理解肿瘤的发生、抗肿瘤药物的作用机制、合理用药及寻找新的作用靶点具有重要的理论意义和实用价值。

[0040] 进一步的,上述确定ATR与ERK结合区域的方法中,所述S11后,还包括步骤:

[0041] 根据ATR与ERK的结合区域,进一步确定该ATR与ERK的相互作用位点。

[0042] 进一步的,上述确定ATR与ERK结合区域的方法中,所述S1具体为:

[0043] S1:采用HA标记ERK,所述ERK包括ERK1/2和ERK1/2-kd。

[0044] 进一步的,上述确定ATR与ERK结合区域的方法中,所述S2具体为:

[0045] S2:采用Flag标记ATR,所述ATR包括ATR-kd。

[0046] 进一步的,上述确定ATR与ERK结合区域的方法中,所述S6具体为:

[0047] S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶中的激酶区域或非激酶区域与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域。

[0048] 实施例1

[0049] 一种确定ATR与ERK结合区域的方法,包括以下步骤:

[0050] S1:采用HA标记ERK所述ERK包括ERK1/2和ERK1/2-kd;

[0051] S2:采用Flag标记ATR;

[0052] S3:以HA标记的ERK和Flag标记的ATR构建第一重组质粒;

[0053] S4:将构建的第一重组质粒转染至293T细胞;

[0054] S5:使用HA和Flag标签的抗体对转染第一重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到第一ATR-ATRIP复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

[0055] S6:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与ATR-ATRIP复合体是否存在结合区域;

[0056] S7:若ERK激酶与ATR-ATRIP复合体存在结合区域,则定位ERK激酶与ATR中的结合域;

[0057] S71:以敲除N端的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第二重组质粒;

[0058] S72:以敲除FAT序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第三重组质粒;

[0059] S73:以敲除激酶区域的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第四重组质粒;

[0060] S74:以敲除FATC序列的ATR以Flag标记后,和以HA标记的ERK构建第五重组质粒;

[0061] S8:分别将第二重组质粒、第三重组质粒、第四重组质粒、第五重组质粒转染至

293T细胞;

[0062] S9:使用HA和Flag标签的抗体分别对转染第二重组质粒后的293T细胞、转染第三重组质粒后的293T细胞、转染第四重组质粒后的293T细胞、转染第五重组质粒后的293T细胞进行免疫共沉淀实验,得到相应的第二ATR-ATR1P复合体、第三ATR-ATR1P复合体、第四ATR-ATR1P复合体、第五ATR-ATR1P复合体,并使用western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果;

[0063] S10:根据western blotting实验检测免疫共沉淀实验结果,判断ERK激酶与相应的第二ATR-ATR1P复合体、第三ATR-ATR1P复合体、第四ATR-ATR1P复合体或第五ATR-ATR1P复合体是否存在结合区域;

[0064] S11:若ERK与上述ATR-ATR1P结合区域第二ATR-ATR1P复合体、第三ATR-ATR1P复合体、第四ATR-ATR1P复合体或第五ATR-ATR1P复合体中其中一个复合体存在结合区域,则可确定ATR-与ERK的结合区域;

[0065] S12:根据ATR与ERK的结合区域,进一步确定该ATR与ERK的相互作用位点。

[0066] 综上所述,本发明提供的确定ATR与ERK结合区域的方法中,通过重组质粒转染细胞,并采用免疫共沉淀的方法,确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域,有利于进一步确定这些作用区域在DDR中的功能,从而为进一步阐明ERK激酶在DDR反应中的具体作用机制打下基础,对进一步理解肿瘤的发生、抗肿瘤药物的作用机制、合理用药及寻找新的作用靶点具有重要的理论意义和实用价值。

[0067] 所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书内容所作的等同变换,或直接或间接运用在相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

专利名称(译)	一种确定ATR与ERK结合区域的方法		
公开(公告)号	CN107988255A	公开(公告)日	2018-05-04
申请号	CN2017110998559.1	申请日	2017-10-20
[标]发明人	魏凤香 唐大木 何立智 万新红 裴元元 温丽娟 宿宁 尹爱华		
发明人	魏凤香 唐大木 何立智 万新红 裴元元 温丽娟 宿宁 尹爱华		
IPC分类号	C12N15/85 C12N5/10 G01N33/539 G01N33/68		
CPC分类号	C12N15/85 G01N33/539 G01N33/68		
代理人(译)	张明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种确定ATR与ERK结合区域的方法，本发明的有益效果在于：本发明提供的确定ATR与ERK结合区域的方法中，通过重组质粒转染细胞，并采用免疫共沉淀的方法，确定ERK激酶与ATR蛋白的作用区域，有利于进一步确定这些作用区域在DDR中的功能，从而为进一步阐明ERK激酶在DDR反应中的具体作用机制打下基础，对进一步理解肿瘤的发生、抗肿瘤药物的作用机制、合理用药及寻找新的作用靶点具有重要的理论意义和实用价值。