



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108845145 A

(43)申请公布日 2018.11.20

(21)申请号 201810643829.1

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2018.06.21

C07K 16/06(2006.01)

(71)申请人 大连民族大学

地址 116600 辽宁省大连市经济技术开发区
辽河西路18号

(72)发明人 权春善 张丽影 李容庆 王路路
范若辰 刘佳璐 范圣第 许永斌
郑维

(74)专利代理机构 大连智高专利事务所(特殊
普通合伙) 21235

代理人 李楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

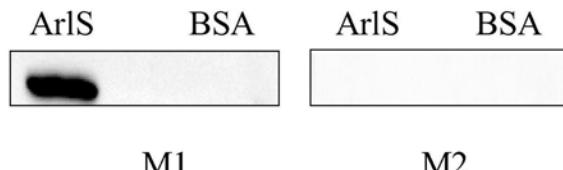
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测组氨酸激酶活性的方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测组氨酸激酶活性的方法,属于生物技术领域。主要技术方案如下:制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原;制备磷酸化组氨酸结构类似物抗体;制备待检测蛋白样品;电泳;转膜;磷酸化组氨酸结构类似物抗体孵育、二抗孵育:将封闭后的PVDF膜放在装有1-(2-氨基丁基)-1-氯-4-基膦酸抗体溶液的盒子内,4℃条件下摇动孵育2小时;显影。本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种制备方便、成本低廉、特异性强、高效灵敏的磷酸化组氨酸结构类似物抗体,该抗体即可用于组氨酸激酶活性的检测,也可用于组氨酸磷酸化蛋白的检测。

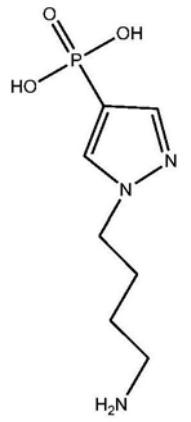


1. 一种检测组氨酸激酶活性的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(一) 制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原

称取磷酸化组氨酸结构类似物、N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐依次溶于N,N-二甲基甲酰胺中,20-30℃下搅拌反应,得到活化溶液A;称取载体蛋白溶于碳酸氢钠溶液中,磁力搅拌,得到溶液B;在冰水浴下,将活化溶液A缓慢滴加到溶液B中,磁力搅拌,得到溶液C;将溶液C装入透析袋中,透析并离心得到完全抗原;

所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学名称为1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸,所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学式为:



(二) 制备磷酸化组氨酸结构类似物抗体

称取步骤(一)制备的完全抗原与等量的弗氏完全佐剂充分乳化用于基础免疫,或与等量的弗氏不完全佐剂充分乳化用于加强免疫,每次免疫间隔20天,共免疫3次;第三次免疫14天后将免疫动物处死取血,取得100mL血液;先将血液放在冰水浴下静置4小时,然后6000rpm离心10min,得到抗血清,将抗血清经亲和层析纯化得到磷酸化组氨酸结构类似物抗体;

(三) 制备待检测蛋白样品;

(四) 电泳;

(五) 转膜;

(六) 磷酸化组氨酸结构类似物抗体孵育、二抗孵育:将封闭后的PVDF膜放在装有1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体溶液的盒子内,4℃条件下摇动孵育2小时;

(七) 显影。

一种检测组氨酸激酶活性的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种检测组氨酸激酶活性的方法。

背景技术

[0002] 蛋白质磷酸化是生物体内一种广泛存在的蛋白质翻译后修饰形式,这种氨基酸与磷酸基团共价连接的修饰模式对蛋白质结构和功能起到了重要调节作用。例如,微生物的双组分信号转导系统,该系统由跨膜的受体组氨酸激酶 (receptor histidine kinase, RHK) 和胞质内的反应调节蛋白 (response regulator, RR) 组成。当RHK感应到外界环境刺激后,其保守组氨酸残基发生自磷酸化,随后将磷酸基团转移给RR上的保守天冬氨酸残基。RR发生磷酸化后对下游基因的表达进行调控。

[0003] 研究表明双组分信号转导系统不仅对细菌的基本生命活动有调节作用,还参与调控很多病原菌的毒力和耐药机制的产生,与致病性密切相关,被认为是潜在的药物靶标。受体组氨酸激酶作为双组分信号转导系统的核心蛋白,在微生物细胞信号转导过程中发挥着至关重要的作用。因此,简便快速、高灵敏度的组氨酸激酶活性分析方法对于疾病诊断、靶向药物的筛选等都具有重要意义。

[0004] 传统的蛋白激酶活性检测法为放射性法,该方法利用放射性元素 γ ^{32}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。然而,该方法需要复杂的操作步骤,且放射性废弃物对环境及操作人员有很大危害。近年来开发出一系列基于荧光、电化学、表面等离子共振和质谱等技术的新分析方法,这些方法通过富集并选择性分离磷酸化肽段进而实现对蛋白激酶的活性检测,尤其是在丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶的活性检测上,取得了较好的结果。但这些方法在检测组氨酸激酶活性时却遇到了困难。组氨酸激酶催化磷酸基团与氨基酸的结合键为N-P键,它在酸性条件下非常不稳定且丰度很低。有研究显示,在49°C 1mol/L HCl存在的条件下, τ -磷酸化组氨酸的半衰期为18s, τ -磷酸化组氨酸半衰期为25s。然而,常用富集肽段的方法却是在较低的pH条件下进行,如固相金属亲和色谱、金属氧化亲和色谱等,利用 Cu^{2+} 、 Ti^{4+} 、 Fe^{3+} 等金属离子或金属氧化物在酸性环境中选择性地与带负电的磷酸基团结合,实现对磷酸化肽段的有效富集。此外,质谱对磷酸化肽段的检测也需要在酸性环境下进行,检测过程中往往会造成组氨酸磷酸化肽段的丢失。这也意味着由于天然磷酸化组氨酸的不稳定性,很多丝氨酸/苏氨酸激酶/酪氨酸激酶的检测技术无法应用到组氨酸激酶的活性研究上,因此急需开发新型、高效的检测组氨酸激酶活性的分析方法。

发明内容

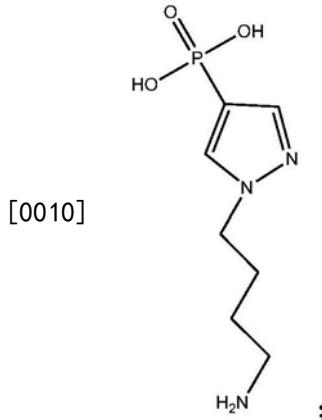
[0005] 为弥补现有技术的不足,本发明以磷酸化组氨酸结构类似物作为半抗原,以动物免疫法获得磷酸化组氨酸结构类似物抗体,并以其为基础,得到一种检测组氨酸激酶活性的方法。

[0006] 本发明的技术方案如下:一种检测组氨酸激酶活性的方法,包括如下步骤:

[0007] (一) 制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原

[0008] 称取磷酸化组氨酸结构类似物、N-羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐依次溶于N,N-二甲基甲酰胺中,20-30℃下搅拌反应,得到活化溶液A;称取载体蛋白溶于碳酸氢钠溶液中,磁力搅拌,得到溶液B;在冰水浴下,将活化溶液A缓慢滴加到溶液B中,磁力搅拌,得到溶液C;将溶液C装入透析袋中,透析并离心得到完全抗原;

[0009] 所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学名称为1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸,所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学式为:



[0011] (二) 制备磷酸化组氨酸结构类似物抗体

[0012] 称取步骤(一)制备的完全抗原与等量的弗氏完全佐剂充分乳化用于基础免疫,或与等量的弗氏不完全佐剂充分乳化用于加强免疫,每次免疫间隔20天,共免疫3次;第三次免疫14天后将免疫动物处死取血,取得100mL血液;先将血液放在冰水浴下静置4小时,然后6000rpm离心10min,得到抗血清,将抗血清经亲和层析纯化得到磷酸化组氨酸结构类似物抗体;

[0013] (三) 制备待检测蛋白样品;

[0014] (四) 电泳;

[0015] (五) 转膜;

[0016] (六) 磷酸化组氨酸结构类似物抗体孵育、二抗孵育:将封闭后的PVDF膜放在装有1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体溶液的盒子内,4℃条件下摇动孵育2小时;

[0017] (七) 显影。

[0018] 本发明的有益效果如下:本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种制备方便、成本低廉、特异性强、高效灵敏的磷酸化组氨酸结构类似物抗体,该抗体即可用于组氨酸激酶活性的检测,也可用于组氨酸磷酸化蛋白的检测。

附图说明

[0019] 图1为本发明的检测结果图。

具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明,若无特殊说明,本发明所用原料及设备均为本领域的常规技术。

[0021] 实施例1磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原的制备

[0022] 采用碳二亚胺反应法,以牛血清蛋白(BSA) 为载体蛋白,制备完全抗原。称取21.9mg (0.1mmol) 1-(2-氨基丁基)-1-氨基-吡唑-4-基膦酸、11.5mg (0.1mmol) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、19.1mg (0.1mmol) 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC) 依次溶于1.5mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 中,在20℃下搅拌反应12h,得到活化溶液A。称取BSA 75mg溶于7.5mL 0.1M的碳酸氢钠溶液中(pH=9.6),磁力搅拌(300rpm),得到溶液B。在冰水浴下,将活化溶液A缓慢滴加到溶液B中,磁力搅拌(400rpm)反应24h,得到溶液C。将溶液C装入透析袋中,用1L 0.01M PBS (pH=7.2) 透析,每8h换液一次,共透析3天。透析产物6000rpm离心10min,得到完全抗原B-BSA。

[0023] 实施例2 1-(2-氨基丁基)-1-氨基-吡唑-4-基膦酸抗体制备(基础免疫)

[0024] 称取上述完全抗原B-BSA 2mg与等量的弗氏完全佐剂充分乳化用于基础免疫。免疫方式是对新西兰大白兔背部皮内多点注射,每只兔子每次用量0.5mg/kg。

[0025] 实施例3 1-(2-氨基丁基)-1-氨基-吡唑-4-基膦酸抗体制备(加强免疫)

[0026] 基础免疫20天后,称取上述完全抗原B-BSA 2mg与等量的弗氏不完全佐剂充分乳化用于加强免疫。免疫方式是对新西兰大白兔背部皮内多点注射,进行第一次加强免疫。再间隔20天,进行第二次加强免疫,每只兔子每次用量0.5mg/kg。第二次加强免疫后14天,将免疫动物处死取血。先将血液放在冰水浴下静置4h,6000rpm、离心10min,并测定抗血清效价,直到其效价达到一定数值,得到1-(2-氨基丁基)-1-氨基-吡唑-4-基膦酸抗体,将制备好的抗体保存在-20℃备用。

[0027] 实施例4组氨酸激酶活性的检测

[0028] 1、蛋白样品制备

[0029] 取60μg金黄色葡萄球菌ar1双组分信号转导系统受体蛋白Ar1S(组氨酸激酶)分装在两支1.5mL离心管中,编号C1(磷酸化)和C2(去磷酸化)。C1中依次加入5mM ATP、5mM MgCl₂、10mMβ-Me、20mM HEPES、150mM NaCl,在37℃下反应30min。C2中依次加入5mM MgCl₂、10mMβ-Me、20mM HEPES、150mM NaCl,在37℃条件下反应30min,然后再加入500mM羟胺,在37℃条件下反应60min。

[0030] 取60μg牛血清蛋白BSA分装在两支1.5mL离心管中,编号B1(磷酸化)和B2(去磷酸化)。B1中依次加入5mM ATP、5mM MgCl₂、10mMβ-Me、20mM HEPES、150mM NaCl,在37℃下反应30min。B2中依次加入5mM MgCl₂、10mMβ-Me、20mM HEPES、150mM NaCl,在37℃条件下反应30min,然后再加入500mM羟胺,在37℃条件下反应60min。

[0031] 反应结束后,C1、C2、B1和B2均在100℃金属浴下加热5分钟,使蛋白变性。

[0032] 2、电泳

[0033] 配制SDS-PAGE电泳胶2块,分别编号为J1、J2。电泳胶J1上样顺序为C1、B1;电泳胶J2上样顺序为C2、B2。

[0034] 3、转膜

[0035] 以电泳胶J1为例,用15mL无水甲醇浸泡50×82mm PVDF膜30秒,再用15mL×TBS-T缓冲液浸泡PVDF膜15分钟。滤纸用20mL Transfer Buffer浸泡15分钟。用镊子依次夹取两张滤纸叠放在转膜仪上,一张PVDF膜放在滤纸上,一张电泳胶放在PVDF膜上,两张滤纸盖在电泳胶上。用镊子抚平滤纸,除去气泡,开启转膜仪,设置电流80mA,时间40分钟。

[0036] 电泳胶J2转膜方法及步骤与电泳胶J1一致。电泳胶J1、J2转膜后的PVDF膜分别为

M1、M2。

[0037] 4、磷酸化组氨酸结构类似物抗体孵育、二抗孵育

[0038] 以PVDF膜M1为例,转膜结束后将PVDF膜放入20mL封闭液中,封闭半小时。随后,将封闭后的PVDF膜放在装有5mL(抗血清B:封闭液=1:1000)1-(2-氨基丁基)-1-氨基-吡唑-4-基磷酸抗体溶液的盒子内,4℃条件下缓慢摇动孵育2小时。用15mL×TBS-T缓冲液洗涤抗体A孵育后的PVDF膜,每次5分钟,共洗涤8次。将封闭后的PVDF膜放在装有5mL(二抗:封闭液=1:1000)二抗溶液盒子内,4℃条件下缓慢摇动孵育2小时。用15mL×TBS-T缓冲液洗涤二抗孵育后的PVDF膜,每次5分钟,共洗涤8次。

[0039] PVDF膜M2转膜方法及步骤与PVDF膜M1一致。

[0040] 5、显影

[0041] 以PVDF膜M1为例,先将10×10cm保鲜膜平铺在试验台上,再将洗涤后的M1放在保鲜膜上。用移液枪移取1mL显影液润洗PVDF膜M1 3分钟,再用吸水纸将多余显影液吸干,最后将PVDF膜M1放在全自动化学发光图像分析仪内显影。

[0042] 结果如图1所示,当Ar1S激酶自体磷酸化后,本发明所制备的抗体能特异性的对其进行识别。而BSA不具备激酶活性,无法自体磷酸化,因此抗体对其不进行识别。当Ar1S蛋白去磷酸化后,抗体也无法对其进行识别。上述结果表明,本发明制备的抗体能够成功检测组氨酸激酶的活性。

[0043] 上述实施例只是用于对本发明的举例和说明,而非意在将本发明限制于所描述的实施例范围内。此外本领域技术人员可以理解的是,本发明不局限于上述实施例,根据本发明的教导还可以做出更多种的变型和修改,这些变型和修改均落在本发明所要求保护的范围内。

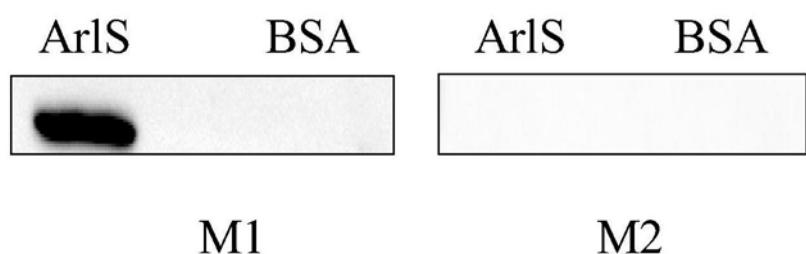


图1

专利名称(译)	一种检测组氨酸激酶活性的方法		
公开(公告)号	CN108845145A	公开(公告)日	2018-11-20
申请号	CN201810643829.1	申请日	2018-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	大连民族学院		
申请(专利权)人(译)	大连民族大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连民族大学		
[标]发明人	权春善 张丽影 李容庆 王路路 范若辰 刘佳璐 范圣第 许永斌 郑维		
发明人	权春善 张丽影 李容庆 王路路 范若辰 刘佳璐 范圣第 许永斌 郑维		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/573 G01N33/531 C07K16/44 C07K16/06		
CPC分类号	G01N33/68 C07K16/06 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/573 G01N2333/912		
代理人(译)	李楠		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种检测组氨酸激酶活性的方法，属于生物技术领域。主要技术方案如下：制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原；制备磷酸化组氨酸结构类似物抗体；制备待检测蛋白样品；电泳；转膜；磷酸化组氨酸结构类似物抗体孵育、二抗孵育：将封闭后的PVDF膜放在装有1-(2-氨基丁基)-1-氯-4-基膦酸抗体溶液的盒子内，4℃条件下摇动孵育2小时；显影。本发明的目的在于克服现有技术的不足之处，提供一种制备方便、成本低廉、特异性强、高效灵敏的磷酸化组氨酸结构类似物抗体，该抗体即可用于组氨酸激酶活性的检测，也可用于组氨酸磷酸化蛋白的检测。

