



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109030828 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201810645727.3

(22)申请日 2018.06.21

(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 范圣第

(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 33/531(2006.01)

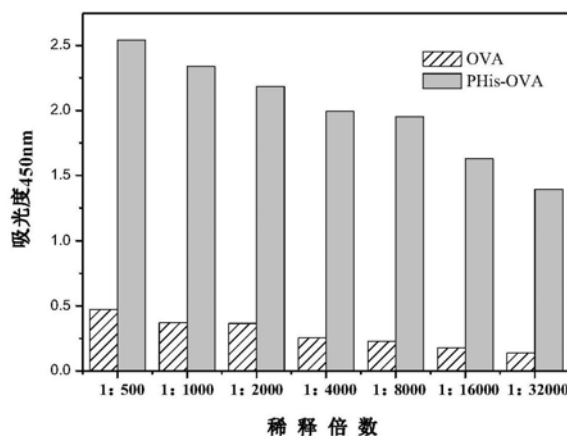
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法,属于生物技术领域。主要技术方案如下:一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒,包括:包被有组氨酸磷酸化OVA蛋白包被抗原的酶标板、酶标物、洗涤缓冲液、包被缓冲液、封闭液、磷酸化组氨酸结构类似物抗体、底物显色液、反应终止液;所述酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体;所述洗涤缓冲液为25mM Tris pH 8.5,137mM NaCl,2.7mM KCl,0.1%v/v吐温20。本发明提供组氨酸磷酸化蛋白抗体纯度高,特异性结合能力好。本发明采用的组氨酸磷酸化蛋白检测方法操作简单,高效灵敏,易于标准化。



1. 一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒,其特征在于,包括:包被有组氨酸磷酸化OVA蛋白包被抗原的酶标板、酶标物、洗涤缓冲液、包被缓冲液、封闭液、磷酸化组氨酸结构类似物抗体、底物显色液、反应终止液;

所述酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体;

所述洗涤缓冲液为25mM Tris pH 8.5,137mM NaCl,2.7mM KCl,0.1%v/v吐温20;

所述包被缓冲液为0.015M Na₂CO₃,0.035M NaHCO₃,pH 9.6;

所述封闭液为1wt%BSA的PBST;

所述底物显色液为TMB显色液;

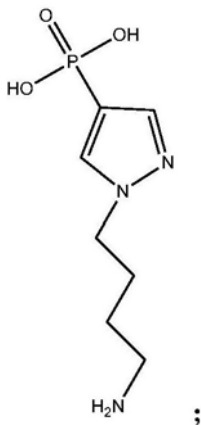
所述反应终止液为2M H₂SO₄;

所述磷酸化组氨酸结构类似物抗体的制备方法如下:

(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-(4-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基磷酸,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。

2. 如权利要求1所述的检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

将100μL组氨酸磷酸化OVA蛋白用900μL包被缓冲液稀释后,加入酶标板中,在酶标板孔中,加入相同体积的磷酸化组氨酸结构类似物抗体及组氨酸磷酸化OVA蛋白,在37℃恒温箱中孵育1h,然后用洗涤缓冲液洗涤3次;

在酶标板各孔中加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体50μL,在37℃恒温箱中孵育

1h,然后用洗涤缓冲液洗涤3次;

加入底物显色液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,待显色反应结束后,加入反应终止液,每孔50 μ L;将酶标板置于酶标仪中,于450nm波长处测定检测结果。

一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法

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磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法。

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,并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来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,取得了比较好的结果。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。这也就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/酪氨酸激酶磷酸化检测技术无法应用到组氨酸磷酸化蛋白的活性研究上,因此急需开发新型、高效的组氨酸激酶检测活性分析方法。

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类似物作为半抗原,以动物免疫法获得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磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒。

[0006] 本发明的技术方案如下：一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒，包括：包被有组氨酸磷酸化OVA蛋白 (PHis-OVA) 包被抗原的酶标板、酶标物、洗涤缓冲液、包被缓冲液、封闭液、磷酸化组氨酸结构类似物抗体、底物显色液、反应终止液；

[0007] 所述酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体；

[0008] 所述洗涤缓冲液为25mM Tris pH 8.5, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% v/v吐温20；

[0009] 所述包被缓冲液为0.015M Na₂CO₃, 0.035M NaHCO₃, pH 9.6；

[0010] 所述封闭液为1wt% BSA的PBST；

[0011] 所述底物显色液为TMB显色液；

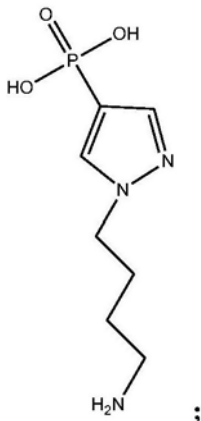
[0012] 所述反应终止液为2M H₂SO₄；

[0013] 所述磷酸化组氨酸结构类似物抗体的制备方法如下：

[0014] (一) 制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原

[0015] 称取磷酸化组氨酸结构类似物、N-羧基琥珀酰亚胺、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；

[0016] 所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学名称为：1-(4-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基磷酸，所述磷酸化组氨酸结构类似物的化学式为：



[0017]

[0018] (二) 制备磷酸化组氨酸结构类似物抗体

[0019] 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。

[0020] 利用所述的检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒进行检测的方法，包括以下步骤：

[0021] 将100μL PHis-OVA并用900μL包被缓冲液稀释后，加入酶标板中，在酶标板孔中，加入相同体积的磷酸化组氨酸结构类似物抗体及PHis-OVA，在37℃恒温箱中孵育1h，然后用洗涤缓冲液洗涤3次；

[0022] 在酶标板各孔中加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体50μL，在37℃恒温箱中孵育1h，然后用洗涤缓冲液洗涤3次；

[0023] 加入底物显色液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,待显色反应结束后,加入反应终止液,每孔50 μ L;将酶标板置于酶标仪中,于450nm波长处测定检测结果。

[0024] 本发明的有益效果如下:

[0025] (1) 本发明提供的组氨酸磷酸化蛋白抗体纯度高,特异性结合能力好。

[0026] (2) 本发明采用的组氨酸磷酸化蛋白检测方法操作简单,高效灵敏,易于标准化。

附图说明

[0027] 图1为本发明的检测结果图。

具体实施方式

[0028] 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。

[0029] 实施例1制备磷酸化组氨酸结构类似物完全抗原

[0030] 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-氢-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 $^{\circ}$ C下搅拌反应12h,得到活化溶液A。称取牛75mg BSA溶于7.5mL 0.1M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。

[0031] 实施例2 1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体的制备(基础免疫)

[0032] 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。

[0033] 实施例3 1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体的制备(加强免疫)

[0034] 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,并测定抗血清效价值,直到其效价值达到一定数值,得到1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体,将制备好的抗体保存在-20 $^{\circ}$ C备用。

[0035] 实施例4一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒

[0036] 包括以下组分:

[0037] (1) 包被有组氨酸磷酸化OVA蛋白包被抗原的酶标板;

[0038] (2) 1-(2-氨基丁基)-1-氢-吡唑-4-基膦酸抗体;

[0039] (3) 洗涤缓冲液为25mM Tris pH 8.5,137mM NaCl,2.7mM KCl,0.1%v/v吐温20;

[0040] (4) 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体;

[0041] (5) 包被缓冲液:0.015M Na₂CO₃,0.035M NaHCO₃,pH 9.6;

[0042] (6) 封闭液为1%BSA的PBST;

[0043] (7) 底物显色液包括底物液I:25mg TMB溶于2.5mL DMSO中;底物液II:称取 β -糊精0.652g、无水乙酸钠2.05g、过氧化氢脲107.15g于200mL烧杯中,加入200mL超纯水溶解,移至250mL容量瓶中定容。使用前将0.9mL底物液I和29.2mL底物液II充分混合;

[0044] (9) 反应终止液为2M H_2SO_4 。

[0045] 实施例5利用检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒检测组氨酸磷酸化蛋白

[0046] 包括以下步骤:

[0047] (1) 取100 μ L组氨酸磷酸化OVA蛋白并用900 μ L包被缓冲液稀释,再将包被稀释液加入酶标板中;

[0048] (2) 在包被有抗原并封闭好的酶标板孔中,加入相同体积的磷酸化组氨酸结构类似物抗体及Phis-OVA,在37 $^{\circ}C$ 恒温箱中孵育1h,然后用洗涤缓冲液洗涤3次,并将酶标板拍干;

[0049] (3) 在酶标板各孔中加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体50 μ L,在37 $^{\circ}C$ 恒温箱中孵育1h,然后用洗涤缓冲液洗涤3次;

[0050] (4) 加入新鲜配制的底物酶标板物显色液,每孔100 μ L,37 $^{\circ}C$ 孵育1h;

[0051] (5) 待显色反应结束后,加入反应终止液,每孔50 μ L;

[0052] (6) 将酶标板置于酶标仪中,于450nm波长处测定检测结果。

[0053] 图1为Elisa试剂盒检测结果,从图中可见,本发明制备的磷酸化组氨酸结构类似物抗体对Phis-OVA表现出优异的识别能力,当磷酸化组氨酸结构类似物抗体稀释32000倍时,识别能力依然较高。本发明具有高特异性、高灵敏度、高通量、操作简便等优点,为检测组氨酸磷酸化蛋白提供了有效的方法。

[0054] 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。

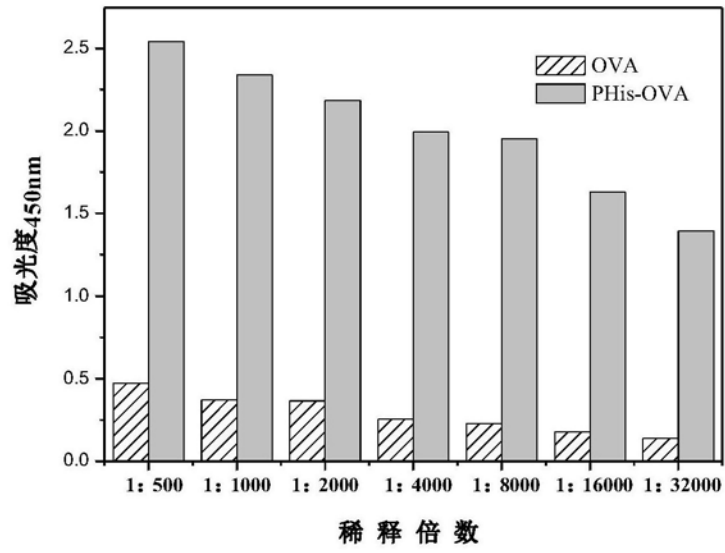


图1

专利名称(译)	一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN109030828A	公开(公告)日	2018-12-18
申请号	CN201810645727.3	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 范圣第		
发明人	权春善 张丽影 李容庆 范圣第		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/531		
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磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒及检测方法，属于生物技术领域。主要技术方案如下：一种检测组氨酸磷酸化蛋白的ELISA检测试剂盒，包括：包被有组氨酸磷酸化OVA蛋白包被抗原的酶标板、酶标物、洗涤缓冲液、包被缓冲液、封闭液、磷酸化组氨酸结构类似物抗体、底物显色液、反应终止液；所述酶标物为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体；所述洗涤缓冲液为25mM Tris pH 8.5，137mM NaCl，2.7mM KCl，0.1%v/v吐温20。本发明提供组氨酸磷酸化蛋白抗体纯度高，特异性结合能力好。本发明采用的组氨酸磷酸化蛋白检测方法操作简单，高效灵敏，易于标准化。

