

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/25



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01134920.4

[43] 公开日 2003 年 5 月 21 日

[11] 公开号 CN 1418967A

[22] 申请日 2001.11.14 [21] 申请号 01134920.4

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

[72] 发明人 乐加昌

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 姜兆元

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 4 页

[54] 发明名称 磷脂酰肌醇蛋白激酶类的活性测定
试剂盒

[57] 摘要

一种用于磷脂酰肌醇蛋白激酶类及其亚类的活性快速测定的试剂盒，其特征在于该测定试剂盒有如下组成：一块由待测的磷脂酰肌醇蛋白激酶相对应的底物和磷脂预先包埋好的 96 孔板；酶活性测定 Tris—HCl 溶液；酶反应终止与洗涤 HCl 液以及薄层滴样用氯仿—HCl 专用液所组成。

1. 一种用于磷脂酰肌醇蛋白激酶类及其亚类的活性快速测定的试剂
5 盒，其特征在于该测定试剂盒有如下组成：一块由待测的磷脂酰肌醇蛋
白激酶相对应的底物和磷脂预先包埋好的 96 孔板；酶活性测定 Tris-HCl
溶液；酶反应终止与洗涤 HCl 液以及薄层滴样用氯仿-HCl 专用液所组成。
2. 根据权利要求 1 中所述的试剂盒的组成，其中所述的由待测的磷
脂酰肌醇蛋白激酶相对应的底物和磷脂预先包埋好的 96 孔板，其中相对
10 应的底物为 PI 或 PIP 或 PIP₂。
3. 根据权利要求 1 中所述的试剂盒的组成，其中所述的酶活性测定
溶液组成为：Tris-HCl 20 mM， pH 7.4；10 mM DTT, 50 mM ATP, 10 mM
MgCl₂, 2 mM EGTA 和 ³²P-r-ATP。
4. 根据权利要求 1 中所述的试剂盒的组成，其中所述的酶反应活性
15 终止与洗涤液为 0.01 N HCl。
5. 根据权利要求 1 中所述的试剂盒的组成，其中所述的薄层滴样用
专用液为氯仿加浓 HCl。
6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒在磷脂酰肌醇蛋白激酶类 PI3K,
PI4K, PIP5K 以及它们亚类活性测定中应用。

磷脂酰肌醇蛋白激酶类的活性测定试剂盒

5

技术领域

本发明属于生物化学酶试剂盒检测领域，具体适合于磷脂酰肌醇蛋白激酶类，以及各种相关脂酶活性的固相法测定。

10 背景技术

细胞的信号转导已成为当前生命科学研究中最活的研究前沿与热点，磷脂酰肌醇在细胞信号转导过程中起中心作用，磷脂酰肌醇（ $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ）的主要作用被认为是磷酸肌醇双信使系统 IP_3/DAG 的前体，在激动剂刺激靶细胞时，被磷脂酶 C 水解产生 IP_3/DAG ，分别启动细胞内 Ca^{2+} 信号系统和特异性激活 PKC。近来研究表明磷脂酰肌醇 $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ 还可以作为 PI3K 的底物，合成 $\text{PtdIns}(3, 4,5)\text{P}_3$ ，磷脂酰肌醇作为信号的前体，在激动剂作用下产生第二信使；本身也可作为脂质第二信使直接参与许多细胞活动，如离子转运，膜转运，信号转导，细胞骨架再组装和核基因调控。作用细胞的生长，分化以及与人类重要的疾病密切相关。特别在人类重要疾病的靶向药物的选择方面磷酸肌醇信号系统起十分重要作用。

面对日益增加的磷脂酰肌醇激酶在细胞信号转导过程中起中心作用被人们所重视，磷脂酰肌醇代谢过程中的重要蛋白激酶 (PI4k, PI3K, PIP5K 等)它的活性测定需求日益上升；然而，传统的磷脂酰肌醇蛋白激酶活性测定所用的方法存在许多缺点：如操作繁琐，重复性差，以及不能大规模活性测定，而且对于操作者存在着放射性同位素辐照损伤的危险。为此改进传统蛋白激酶活性测定方法。特别在临床的靶向药物的选择中显得特别重要。

30 技术内容

磷脂酰肌醇激酶活性试剂盒的设计:

1. 底物的包被: 由有机溶剂将磷脂溶解后在放入 96 孔板中在 4°C 条件下过夜, 然后用 PBS 洗涤三遍。

2. 封闭多余的空间: 为了封闭多余的空间再加入 3 % 的牛血清白蛋白, 室温下孵浴一小时后, 用 PBST (0.02% Tween) 洗涤三遍。

3. 磷脂酰肌醇激酶(或膜样品, 或细胞裂解液)的吸附: 然后加入需要测定的磷脂酰肌醇激酶(或膜样品, 或细胞裂解液)在室温下孵浴一小时将其吸附在固体板上后, 再移去多余的溶液;

4. 活性的测定: 然后加入测活的溶液 Tris-HCl 20 mM, pH 7.4; 10 mM DTT, 50 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA 和 ³²P-r-ATP (50-100 μ l), 在 36 °C 条件下反应 10 分钟。中断反应用预先冷致 4°C 的终止反应与洗涤溶液 0.01N HCl 洗涤五遍。洗去未反应的 ³²P-r-ATP。反应产物 ³²PIP 簿层滴样用专用氯仿浓 HCl 液溶解, 并用 TLC 薄板分离后, (用标准 PIP 为对照) 进行同位素计数。

按上述条件我们进行了不同磷脂酰肌醇激酶浓度与测活性的相关性, 不同底物浓度与磷脂酰肌醇激酶的活性相关性, 以及固相磷脂在不同浓度的去污剂对其稳定性的试验; 上述试验表明本发明的实验重复性可靠性适合实验要求, 不但可以用纯化的磷脂酰肌醇激酶进行试验, 而且可以用细胞的裂解液中 PI K 的活性测定, 以及快速和适用性广泛。本方法极大地减少了放射性同位素辐射造成对操作人员健康的危害程度, 以及适合于大规模生物样品实验; 因此该方法对于磷脂酰肌醇蛋白激酶 (或其它磷脂蛋白激酶的活性的测定均可以应用, 但是需要各自活性测定试剂盒。)

附图说明

图 1 为 PI K 试剂盒反应图示

图 2 a 为 PI4K 浓度与其酶的活性相关性 (PI 2 μ g)

图 2 b 为 PI 浓度与其酶的活性相关性 (PI4K 10 μ g)

图 3 A 为人红细胞浓度与其酶的活性相关性 (PI 2 μ g)

图 3 B 为正常人红细胞膜与 PNH 病人内翻外血影膜的 PI4K 活性测定

每个样品中蛋白浓度为 $10 \mu\text{g}$.

图 4 为用固相法对巨噬细胞裂解液中 PI4K 的活性测定

实施例 1:

5 纯化的 PI4K 活性测定

在 96 孔板上分别用磷脂以每孔 $3 \mu\text{g}$, 和 PI $2 \mu\text{g}$ (或不等) 溶解在甲醇: 三氯甲烷(20:1)在 4°C 条件下过夜, 然后用 PBS 洗涤三遍, 加入 3 % 的牛血清白蛋白室温下一小时封闭, 用 PBST 洗涤三遍。然后加入需要的测定磷脂酰肌醇激酶, (PI4 K) , 0, 0.1; 0.3, 1, 10 μg (或不同 PI 浓度的
10 条件下, 固定磷脂酰肌醇激酶浓度) 在室温下一小时后, 起移去多余的样品, 然后加入 测酶活性的溶液,(50ul-60ul), 包含 ^{32}P -ATP, 在 36°C 条件下反应 10 分钟。 中断反应用 4°C 蒸馏水洗涤三遍。洗去未反应的 ^{32}P -ATP。反应产物 ^{32}PIP 用三氯甲烷溶解, 并在 TLC 薄板, 用标准 PIP 为对照, 用同位素仪进行计数.实验结果见图 2 a (或 b) 。从
15 图结果说明该方法, 当底物固定, PI4K 的活性随着其浓度的增加而增加, 其增加的线性关系说明该方法可靠性。图 2 B 说明当酶的浓度固定, 底物浓度变化, 这时 PI4K 的活性随底物 (PI) 增加而增加, 并且其增加的关系与底物的浓度呈线性关系, 该实验进一步说明该方法的可靠。

20 实施例 2: 人红细胞膜中 PI4K 的活性测定。

首先将人红细胞制备成血影膜, 然后制备成内翻外血影膜, 目的是为了将要测试的磷脂酰肌醇激酶暴露在外。其它条件同上。加入需要的测定的内翻外血影膜, 0, 0.1; 0.3, 1, 10 μg 在室温下一小时后, 起移去多余的溶液, 然后加入 测活性的溶液,(50-60 μl), 包含 ^{32}P -ATP, 在
25 36°C 条件下反应 10 分钟。 中断反应用 4°C 蒸馏水洗涤三遍。洗去未反应的 ^{32}P -ATP。反应产物 ^{32}PIP 用三氯甲烷溶解, 并在 TLC 薄板, 用标准 PIP 为对照, 用同位素仪进行计数.实验结果见图 3。

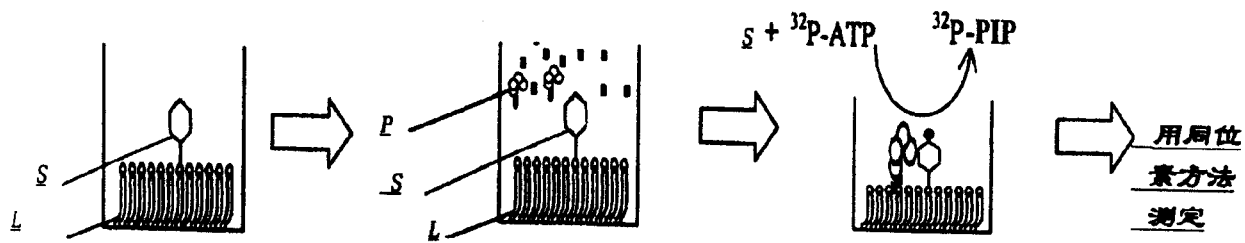
图 3 我们可以看到本发明不但适合纯化的 PI4K 应用, 而且也可以用于人细胞膜的样品。该样品随着蛋白浓度增加而酶的活力也增加, 并且它们之间存在线性关系。说明该方法的应用可靠性。图 3 B 是应用本
30

法明方法与传统的方法对于正常人红细胞与夜间阵发性出血证病人红血球中 PI4K 活性的对比。结果表明：两种方法同时证明病人红血球种的 PI4K 活性要明显高于正常人红血球中 PI4K 活性。

5 实施例 3：巨噬细胞裂解液中 PI4K 的活性测定

上述已经证明了本发明可以应用在纯化或不纯化的样品 PI4K 酶活的测定，下面用细胞的体系制备的样品研究本方法的适用性。

用 1% Triton X-100 将小鼠腹腔巨噬细胞(预先制备与纯化)溶解，然后用 PBS 将其配成 0.1% Triton X-100,其它同上进行操作，结果见图 4。图 4. 3×10^6 的小鼠巨噬细胞用 $30 \mu\text{l}$ 1% Triton X-100 将细胞溶解，然后将样品用 PBS 将其配成 1% Triton X-100，加入到反应试剂盒。其它操作同上。结果表明固相法可以测到细胞水平 PI4K 酶的活性，PAO 为 PI4K 的以抑制剂。该结果与正常方法得到结果相一致。



(S: PI; PIP; PIP₂; L: 各种磷脂; P: 酶)

图 1

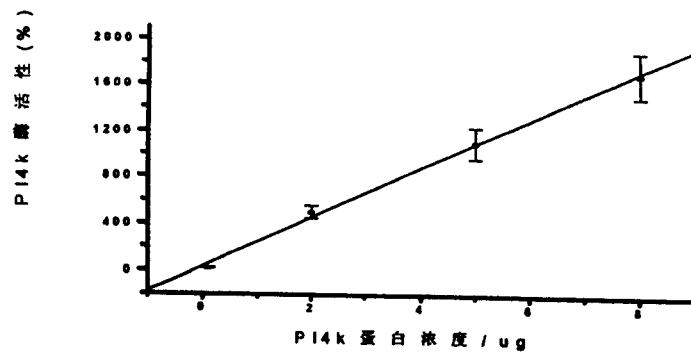


图 2a

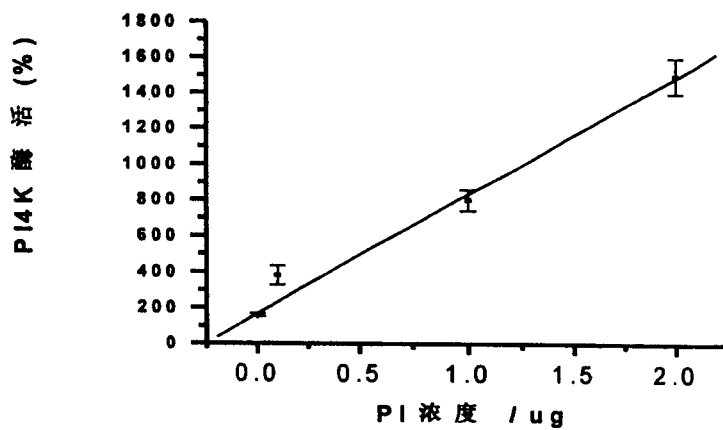


图 2b

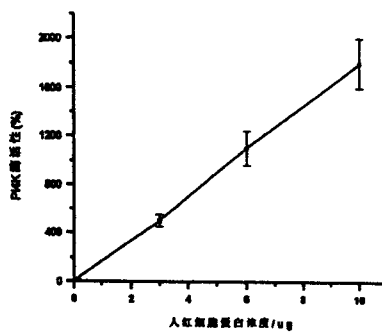


图 3a

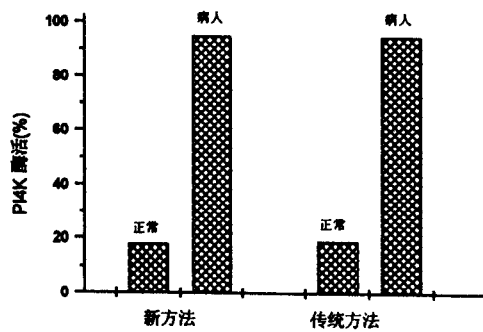


图 3b

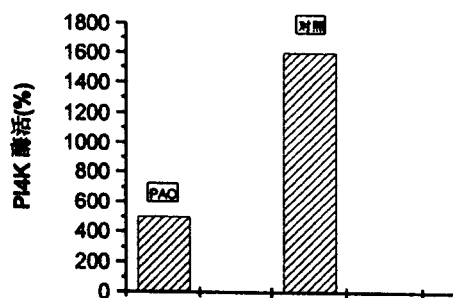


图 4