

技术与方法

酪氨酸蛋白激酶底物的 ELISA 测定及应用*

张明志 张光毅 赵升皓

(徐州医学院细胞调控研究室, 徐州 221002)

提 要

用合成的磷酸酪氨酸牛血清白蛋白 (P-tyr-BSA) 免疫家兔得抗血清, 此抗血清与 3 种磷蛋白均有交叉反应. 将 IgG 纯化并与辣根过氧化物酶偶联, 经 Sephadex G-200 纯化得酶标结合物. 纯化的 IgG 只与载体牛血清白蛋白和磷酸酪氨酸蛋白有交叉反应. ELISA (酶联免疫吸附测定法) 的最小检出量为 2—4ng, 与被检磷酸酪氨酸蛋白均有交叉反应, 但与磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸蛋白及其他含磷酸物质无交叉反应. 样品变异系数, 批间和批内均小于 5%. 血清磷酸酪氨酸蛋白检测结果: 20 例正常人均阴性, 20 例急性淋巴细胞性白血病 18 例阳性, 14 例非急性淋巴细胞性白血病均阳性.

关键词 磷酸酪氨酸蛋白, 抗血清, 酶联免疫吸附测定

酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TPK) 作为逆转录病毒转化产物的一个性质而被发现^[1]. 以后人们又发现, 一些重要的生长因子如: EGF, PDGF, 胰岛素及 IGF-1 等的受体均具有 TPK 的活性^[2]. TPK 在细胞增殖、细胞转化和代谢调控等许多方面均起着十分重要的作用. TPK 专一催化蛋白质酪氨酸残基磷酸化. 蛋白质磷酸化位点主要是丝氨酸 (90%), 其次是苏氨酸 (10%), 而酪氨酸仅占 0.05%^[3]. 因此, 建立灵敏而专一的鉴定和检测 TPK 底物, 即磷酸酪氨酸蛋白 (P-tyr-Pr) 的方法, 对研究 TPK 的功能是非常重要的.

磷酸丝氨酸 (P-ser) 和磷酸苏氨酸 (P-thr) 对碱不稳定而易于水解, 而磷酸酪氨酸 (P-tyr) 则不易被碱水解. 利用这一特性, Cooper 和 Hunter^[4]将凝胶用 1mol/L KOH 55℃ 处理 2h, 然后放射自显影来检测 P-tyr-Pr. 这种方法灵敏度低, 背景颜色深, 并不是所有 P-ser 和 P-thr 均被水解, 且操作过程复杂. 我们建立

了灵敏度高、特异性强的 P-tyr-Pr 鉴定及测定方法, 并初步应用于基础研究.

1 材料和方法

1.1 试剂

P-ser、P-thr、P-tyr、BSA、卵清蛋白 (OA)、溶菌酶 (Ly) 和辣根过氧化物酶 (HRP) 均系 Sigma 产品, 碳化二亚胺 (EDC) 系 E. Merck 产品.

1.2 抗血清的制备

1.2.1 磷蛋白的合成: 取 4mg P-tyr, 溶于 0.1mol/L (pH6.0) 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 缓慢加入 0.6ml (5mg) EDC, 4℃ 搅拌过夜, 加入 4ml BSA (25mg, 溶于 PBS, pH7.0), 继续反应 4h, 加入 0.6ml EDC, 反应 1h 后 4℃ 静置过夜. 上述步骤均应避光. 反应液对 PBS 透析

* 本文属江苏教委自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1992-01-30 修回日期: 1992-03-26

3d, 换液6次, 所得物质即为 P-tyr-BSA, 置于 -30°C 冰箱保存. 其他磷蛋白的合成同 P-tyr-BSA.

1.2.2 抗血清制备: 将合成的 P-tyr-BSA 与等量的完全或不完全福氏佐剂混合后免疫 California 白兔. 免疫方法: 背部多点皮内及四足垫皮下注射. 基础免疫2次, 间歇2周, 免疫原用量为 1mg/kg 体重. 加强免疫时, 免疫原用量减半, 间歇3周.

1.3 抗体的纯化和标记

抗体的纯化和标记参照文献 [5] 法进行.

1.4 抗血清和纯化 IgG 的特异性

将各种物质用 PBS 从 $10\mu\text{g/ml}$ 开始对倍稀释至 20ng/ml , 取 $1\mu\text{l}$ 点至硝酸纤维素薄膜 (NC) 上; NC 用 0.25% 戊二醛 23°C 固定 45min , 用含 0.05% 吐温-20 的 PBS (PBS-T) 漂洗 $3\text{min} \times 3$ (下同); 1% 明胶封闭 45min ; 洗后加入 $1:60$ 抗血清或 $40\mu\text{g/ml}$ IgG, 37°C 1.5h ; 洗后加入 $1:250$ SPA-HRP, 37°C 1h ; 洗后加底物 ($\text{DAB-H}_2\text{O}_2$) 显色 10min ; 蒸馏水充分洗后, 戊二醛固定 5min ; 滤纸吸干保存.

1.5 ELISA 测定

将纯化的 IgG ($10\mu\text{g/ml}$) 包被于聚苯乙烯反应板孔中, 37°C 2h ; PBS-T 洗 $3\text{min} \times 3$ (下同), 洗后加入样准品或样品, 37°C 1.5h ; 洗后加入用含 2% 正常兔血清的 PBS-T 稀释的

IgG-HRP, 37°C 1h ; 洗后加入底物 ($\text{OPD-H}_2\text{O}_2$) 显色 15min ; 加 2mol/L 硫酸终止反应, 用 DG3022 型酶联免疫检测仪 492nm 测 A 值. 试验设复管, 除硫酸为每孔 $50\mu\text{l}$ 外, 其余均为每孔 $100\mu\text{l}$.

1.6 血样采集

20 例正常人血清取自徐州市中心血站健康自愿献血者, 病人血清取自徐州医学院附属医院经骨髓检查确诊为白血病患者.

1.7 标准曲线作图及样品 P-tyr-Pr 含量的计算

以标准 P-tyr-Pr 含量的对数为横坐标, 对应的 A 值为纵坐标, 作图即为标准曲线. 样品孔的 A 值在标准曲线上查得相应值乘 10 后除以蛋白质含量即为每 mg 蛋白含有的 P-tyr-Pr ng 数.

2 结 果

2.1 抗血清滴度检查

California 白兔经 2 次基础免疫和 2 次加强免疫后, 从耳缘静脉取血用双扩散法检查抗体滴度. 以 BSA 作抗原时效价为 $1:32$, 以 P-tyr-OA 作抗原时效价为 $1:4$; 第 3 次加强免疫之后以 P-tyr-OA 作抗原时效价为 $1:16$, 第 4 次加强免疫后则高达 $1:32$.

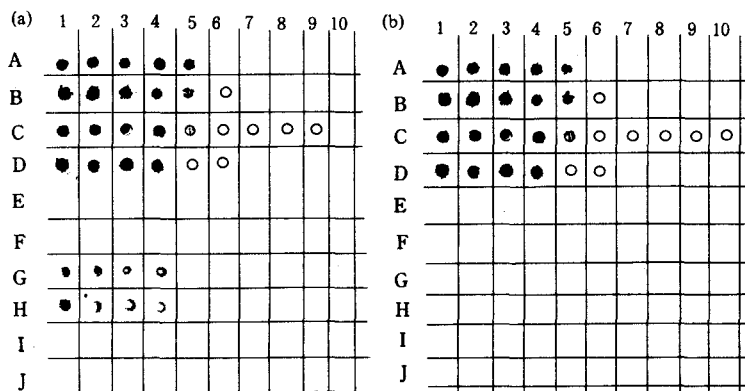


图1 抗血清和纯化 IgG 与各种物质的交叉反应

(a) 抗血清

(b) 纯化 IgG

1—10 抗原含量依次为 $10000, 5000, 2500, 1250, 625, 313, 157, 79, 40, 20\text{pg}$;

A—J 依次为 BSA, P-tyr-BSA, P-tyr-OA, P-tyr-Ly, OA, Ly, P-ser-OA,

P-thr-OA, α -酪蛋白和 PBS-T

2. 2 抗体的纯化和标记

抗血清经一次 50% 和 3 次 33% 饱和度硫酸铵盐析, 再经 PBS 透析后上 DEAE52 纤维素柱层析纯化, 所得 IgG 在醋酸纤维素薄膜上表现为单一区带. IgG 用过碘酸氧化法与 HRP 偶联, 所得酶标结合物用 Sephadex G-200 纯化, 纯化的酶标结合物中 IgG 与 HRP 分子比为 1:1.

2. 3 抗血清和纯化 IgG 的特异性

2. 3. 1 抗血清的特异性: 如图 1a 所示, 抗血清与 BSA 及 3 种磷蛋白均有交叉反应, 与 BSA 和 P-tyr-Pr 反应性强, 与 P-ser-OA 和 P-thr-OA 反应性弱, 但不与非磷蛋白反应.

2. 3. 2 纯化 IgG 的特异性: 如图 1b 所示, 纯化的 IgG 仅与 BSA 和 P-tyr-Pr 有交叉反应, 而不与另外两种磷蛋白和其他非磷蛋白反应.

2. 4 标准曲线的制作

应用半对数坐标纸绘制的标准曲线见图 2. 每个浓度的 A 值均用 $\bar{X} \pm SD$ 表示 ($n=8$). ELISA 最大检出量为 1000ng, 最小检出量为 2—4ng, 以 P-tyr-OA 作为标准蛋白.

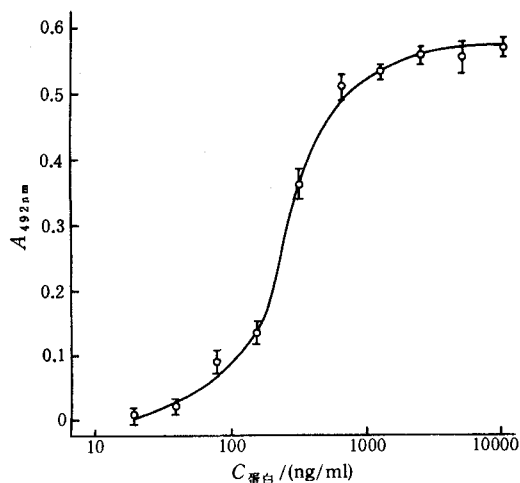


图 2 P-tyr-Pr ELISA 测定的标准曲线

2. 5 ELISA 测定的特异性

尽管纯化的 IgG 不与 P-ser-OA 和 P-thr-OA 起反应, 但可能与 cAMP 和 ATP 等小分子含磷物质起反应. 表 1 为 ELISA 测定所得纯化

IgG 与各种物质的交叉反应. 结果表明 ELISA 对 P-tyr-Pr 的测定不受其他物质的干扰.

2. 6 精密度

本法板内和板间变异系数均小于 5%, 阴性对照小于 1%.

2. 7 正常人和白血病患者血清 P-tyr-Pr 的测定

20 例正常自愿献血者血清中均检测不出 P-tyr-Pr. 34 例白血病患者分为 2 组, 即急性淋巴细胞性白血病患者组和非急性淋巴细胞性白血病患者组, 结果见表 2.

表 1 ELISA 测定时 IgG 与各种物质的交叉反应

被检物质	结果
BSA	+
P-tyr-BSA	+
P-tyr-OA	+
P-ser-OA	—
P-thr-OA	—
OA	—
P-tyr-Ly	+
Ly	—
cAMP	—
ATP	—
α -酪蛋白	—

表 2 正常人和白血病患者血清 P-tyr-Pr 的含量

分组	P-tyr-Pr		
	例数	$\bar{X} \pm SD$ (ng/mg)	阳性率 (%)
正常人	20	—	0
急性淋巴细胞性白血病	20	4.76 ± 2.24	18 (90%)
非急性淋巴细胞性白血病	14	7.22 ± 2.88	14 (100%)

3 讨 论

蛋白质的磷酸化和脱磷酸化是细胞调控的重要机制^[6]. 这一调节系统包括 3 种成分: 蛋白激酶、磷蛋白磷酸酶和蛋白底物. 蛋白激酶使蛋白底物磷酸化, 而磷蛋白磷酸酶则使磷蛋白脱磷酸化, 磷蛋白的多少直接反应了蛋白激酶和磷蛋白磷酸酶综合作用的结果. 故测定磷蛋白的含量比单独测定蛋白激酶或磷蛋白磷酸酶的活性更有意义.

3种磷蛋白,即磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸蛋白和 P-tyr-Pr 的不同之处仅在于磷酸基与不同的氨基酸残基相连,结构上有相似之处。故用 P-tyr-BSA 作抗原免疫家兔所得多克隆抗血清与 3 种磷蛋白均有交叉反应。但是,应该看到, P-tyr 与 P-ser 和 P-thr 相比,多了一个抗原性很强的大苯环,而 P-ser 和 P-thr 仅相差一个抗原性很弱的甲基,故用 P-tyr-BSA 作抗原产生的抗血清尽管与磷酸丝氨酸蛋白和磷酸苏氨酸蛋白有交叉反应,但是反应性均弱(图 1a),特别是抗血清经硫酸铵盐析和 DEAE52 纤维素柱层析纯化所得 IgG 只与 P-tyr-Pr 反应,却与 P-ser-OA 和 P-thr-OA 均不起交叉反应,更说明了 P-thr-Pr 与磷酸丝氨酸蛋白和磷酸苏氨酸蛋白在免疫学性质上的差别。这一结果提示,仅用 P-tyr-BSA 作抗原制备单克隆抗体,有可能得到至少 2 种单克隆抗体,即抗 P-tyr-Pr 抗体和抗磷酸丝氨酸蛋白及磷酸苏氨酸蛋白抗体,我们准备进行这方面的研究。

Ross 等^[7]用 P-tyr-BSA 制备的抗血清与 cAMP 和 ATP 等有较弱交叉反应。我们在鉴定 cAMP、ATP 等是否影响 P-tyr-Pr 测定时,将一系列不同浓度的 cAMP 和 ATP 加至相同浓度的 P-tyr-OA 中,然后观察 P-tyr-OA 与抗体的反应情况。结果,无论在 P-tyr-OA 中加多大浓度的 cAMP 和 ATP 均不影响 P-tyr-OA 和纯化 IgG 的反应。

各种 P-tyr-Pr 之间的共同之处仅在于含有相同的 P-tyr 基团,故我们制作 P-tyr-Pr ELISA 标准曲线时选择 P-tyr-OA 而不选择 BSA 和 P-tyr-BSA 作为标准 P-tyr-Pr,因为抗体与载体 BSA 的亲合力远远高于其他的 P-tyr-Pr。Lin 等^[8]报道,黑色素瘤病人血清 TPK 活性显著高于正常人,我们也发现白血病患者

血清 TPK 活性高于正常人^[9]。但血清中 P-tyr-Pr 尚无人报道。我们在 20 例急性淋巴细胞性白血病患者血清发现 18 例 P-tyr-Pr 阳性,14 例非急性淋巴细胞性白血病患者血清全部阳性,而正常人血清则全部阴性。尽管这一结果不能说明正常人血清中无 P-tyr-Pr,因为正常人血清中可能 P-tyr-Pr 含量太低而检测不出,但的确可以说明白血病患者血清 P-tyr-Pr 的含量高于正常人。

参 考 文 献

- 1 Hunter T, Sefton B M. Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77**: 1311
- 2 Hunter T, Cooper J A. Protein tyrosine kinase. *Ann Rev Biochem*, 1985; **54**: 897
- 3 王志珍, 邹承鲁. 酪氨酸专一的蛋白激酶. 生理科学进展, 1987; **18** (4): 296
- 4 Cooper J A, Hunter T. Identification and characterization of cellular targets for tyrosine protein kinase. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1983; **107**: 125
- 5 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 1983, **3**, 97
- 6 Zhang M Z, Zhang G Y, Zong Y Y *et al.* Changes of Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase I and calmodulin binding protein-15 in cultured aortic smooth muscle cell cycle. *Chin J Physiol Sci*, 1992; **8** (1): 18
- 7 Ross A H, Baltimore D, Eisen H N. Phosphotyrosine containing proteins isolated by affinity chromatography with antibody to a synthetic hapten. *Nature*, 1981; **294**: 654
- 8 Lin M F, Lee P L, Clinton G M. Characterization of tyrosyl kinase activity in human serum. *J Biol Chem*, 1985; **260**: 1582
- 9 冯志民, 张光毅, 魏涌等. 人血液酪氨酸蛋白激酶的研究, (I) 人血液酪氨酸蛋白激酶的测定. 徐州医学院学报, 1990; **10** (2): 94