

技术与方法

p38 丝裂原活化蛋白激酶活性放射自显影测定方法的建立和应用*

闫文生 姜 勇 黄巧冰 赵克森**

(第一军医大学病理生理教研室及全军休克微循环重点实验室, 广州 510515)

摘要 建立 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 放射自显影激酶活性测定方法, 并应用于血管内皮细胞中 p38 MAPK 活性动态变化的研究. 结果表明放射自显影激酶活性测定方法具有很好的量效关系、灵敏性和特异性. 在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的血管内皮细胞, p38 MAPK 在 LPS 刺激 15 min 后活性增高, 30~60 min 达高峰, 120 min 后活性逐渐下降, 较好地反映了 LPS 刺激的内皮细胞中 p38 MAPK 活性的动态变化. 国内实验室完全有可能和条件, 建立本国的放射自显影激酶活性测定方法, 并应用于信号转导的研究.

关键词 p38 丝裂原活化蛋白激酶, 放射自显影激酶活性测定技术, 脂多糖, 血管内皮细胞

学科分类号 R329.2

信号转导是目前世界上生物学和医学领域的一个研究热点, 放射自显影激酶活性检测技术是一个重要研究手段, 其灵敏度高, 特异性好, 在国外一些先进实验室得到广泛的应用. 但因该方法的建立难度较大, 在国内开展缓慢. 为了推动我国在信号转导方面的研究, 本文介绍放射自显影激酶活性检测技术的建立和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活性测定. 首先制备了有活性的 p38 MAPK 及其底物活化转录因子 2 (activating transcription factor 2, ATF2) 融合蛋白, 检测离体下 p38 MAPK 的量效关系, 以及其特异性抑制剂 SB203580 对 p38 MAPK 活性的抑制作用; 并结合免疫沉淀技术, 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的血管内皮细胞中 p38 MAPK 活性的动态变化进行了研究.

1 材 料

抗 p38 MAPK 多克隆抗体 (美国 The Scripps Research Institute, J Han 惠赠), GST-ATF2 和 6×His p38 MAPK 重组质粒 (第一军医大学病理生理教研室姜勇教授构建), 谷胱甘肽琼脂糖 (Glutathione Sepharose 4B) 和 Protein A Sepharose CL-4B (Amersham Pharmacia 公司), γ -³²P-ATP (北京亚辉生物医学工程公司), LPS 和 IPTG (Sigma 公司), Ni²⁺-NTA

agarose (Qiagen 公司), SB203580 (Calbiochem 公司), 中分子质量蛋白质标准 (Promega 公司), 高反差 X 光片显影粉和定影粉 (石家庄化工十厂), X-OMAT 胶片 (KODAK 公司).

2 方 法

2.1 重组 GST-ATF2 融合蛋白的制备

GST-ATF2 重组质粒 (载体为 pGEX) 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态菌株后, 挑一单菌落, 接种于 2 ml LB (Amp⁺) 培养液中, 37℃ 振荡培养至 $A_{600} = 0.6$, 然后稀释到 100 ml LB (Amp⁺) 培养液, 37℃ 和 250 r/min 摇动至 $A_{600} = 1.0$, 加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG), 使其终浓度为 0.1 mmol/L, 继续摇动 2~3 h, 诱导蛋白质表达, 细菌培养液于 4℃, 5 000 g 离心 10 min, 收集沉淀细菌, 加 10 ml 用冰预冷的裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 2 mmol/L 二硫苏糖醇, 2 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 5 mmol/L 苯甲酰胺, 2 mg/L 抑蛋白酶肽) 使细菌重悬, 冰上超声裂解细

* 国家自然科学基金重点项目资助 (39830400).

** 通讯联系人.

Tel: 020-85148232, E-mail: zhaoks@fimmu.edu.cn

收稿日期: 2000-07-04, 接受日期: 2000-08-23

胞, 4℃, 10 000 g离心 20 min. 上清转入装有 1 ml 50% 谷胱甘肽琼脂糖 4B (Glutathione Sepharose 4B) 珠的亲合层析柱中, 用 5 ml 裂解缓冲液冲洗非特异性结合的蛋白, 再用洗脱缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽) 洗脱 GST-ATF2 重组蛋白, 每管收集 0.5 ml. 提纯蛋白质经 PBS 液 4℃透析 12 h, 激酶反应缓冲液 4℃透析 12 h, 聚乙二醇 8 000 浓缩至蛋白质浓度为 4 g/L, -20℃保存备用.

2.2 重组 p38 MAPK 融合蛋白制备

将 6×His-p38 重组质粒 (载体为 pET14b) 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态菌株后, 挑一单菌落, 接种于 2 ml LB (Amp^r) 培养液中, 37℃振荡培养过夜, 然后按 1:100 稀释到 LB (Amp^r) 培养液, 37℃和 250 r/min 摇动至 A₆₀₀=1.0, 加入 IPTG, 使其终浓度为 1 mmol/L, 继续摇动 2~3 h, 诱导蛋白质表达, 细菌培养液于 5 000 g离心 5 min, 收集沉淀细菌, 每 100 ml 原菌培养液的沉淀细菌, 加 5 ml 用冰预冷的结合缓冲液 (50 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 使细菌重悬, 冰上超声裂解细菌, 4℃, 10 000 g离心 20 min, 上清加入到镍-次氨基三乙酸 (nickel nitrilotriacetic acid, Ni²⁺-NTA) 琼脂糖亲合层析柱中, 先后用结合缓冲液 10 ml 和清洗缓冲液 (60 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 6 ml 洗柱, 用洗脱缓冲液 (1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱柱上结合的蛋白质, 每 0.5 ml 收集一管. 提纯蛋白质经 PBS 液 4℃透析 12 h, 激酶反应缓冲液 4℃透析 12 h, 聚乙二醇 8 000 浓缩至蛋白质浓度为 1 g/L, -20℃保存备用.

2.3 离体下 p38 激酶活性测定

2.3.1 激酶活性测定原理: p38 MAPK 的活性体现于其对底物的磷酸化程度. 在适当的激酶反应体系中, p38 MAPK 可把 γ-³²P-ATP 上的 ³²P 磷酸化到其底物 ATF2 上, 通过对带有 ³²P 的 ATF2 进行凝胶电泳分离, X 光片曝光, 以 ATF2 自显影条带的强弱来评价 p38 MAPK 的活性.

2.3.2 离体下 p38 MAPK 量效关系测定: 在适当的激酶反应体系 (250 μmol/L ATP, 10 μg ATF2, 370kBq γ-³²P-ATP) 中分别加入 0.0、0.02、0.1、0.5、2.0、4.0、12.0 μg 有活性的重组 p38 MAPK, 37℃反应 30 min, 加入 10 μl 3×SDS 加样缓冲液 (187.5 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 6%

SDS, 30% 甘油, 150 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.3% 溴酚蓝) 终止反应. 样品煮沸 5 min, 取样品 20 μl 用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 干胶, 用 X 光片于暗盒中, -70℃曝光 12 h, 胶片经显影、定影, 图象用凝胶图象分析系统进行照象和分析.

2.3.3 离体下 SB203580 对 p38 MAPK 活性的抑制效应测定: 在 20 μl 激酶反应体系 (含 0.5 μg 重组 p38 MAPK, 250 μmol/L ATP, 10 μg ATF2, 370kBq γ-³²P-ATP) 中加入 SB203580, 使其终浓度分别达 0.0~100.0 μmol/L. 37℃反应 30 min, 反应后样品处理同上.

2.4 LPS 刺激后内皮细胞 p38 MAPK 活性测定

2.4.1 人脐静脉内皮细胞培养: 取健康产妇分娩后 3 h 内脐带, 用 D-Hank's 将脐静脉内余血冲净, 0.25% 胰蛋白酶消化分离内皮细胞, 接种于培养瓶中, 用 20% 胎牛血清的培养基在 37℃和 5% CO₂ 条件下培养.

2.4.2 内皮细胞 p38 MAPK 活性测定: LPS 分别刺激内皮细胞 0、15、30、60、120、240 min 后, 倒掉培养基, 4℃PBS 液冲洗 1 遍, 加入用冰预冷的细胞裂解液 (25 mmol/L Hepes, pH 7.6, 137 mmol/L NaCl, 3 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 3 mmol/L β-甘油磷酸) 裂解细胞 5 min. 把细胞刮入离心管中, 冰上超声粉碎, 4℃, 10 000 g离心 5 min, 取上清 300 μl (约含蛋白质 300 μg), 加入抗 p38 MAPK 多克隆抗体, 4℃摇动过夜. 加入 50% 蛋白 A 琼脂糖凝胶 CL-4B (protein A sepharose CL-4B) 20 μl, 4℃摇动 3 h, 4℃离心 30 s, 沉淀用 500 μl 细胞裂解液洗涤 2 次, 500 μl 激酶反应缓冲液 (20 mmol/L Hepes, pH 7.6, 20 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L Na₃VO₄, 25 mmol/L β-甘油磷酸, 2 mmol/L 1, 4-二硫苏糖醇) 洗涤 1 次, 沉淀加入 20 μl 激酶反应体系 (含 250 μmol/L ATP, 10 μg ATF2, 370kBq γ-³²P-ATP) 中, 37℃反应 30 min, 反应后样品处理同上.

3 结 果

3.1 GST-ATF2 融合蛋白的表达和纯化

由图 1 可见, GST-ATF2 重组质粒转化的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株经 IPTG 诱导后, GST-ATF2 融合蛋白被显著诱导表达, 经 Glutathione Sepharose 4B 珠亲合层析后, GST-ATF2 得到显著

纯化, 其分子质量约为 40 ku.

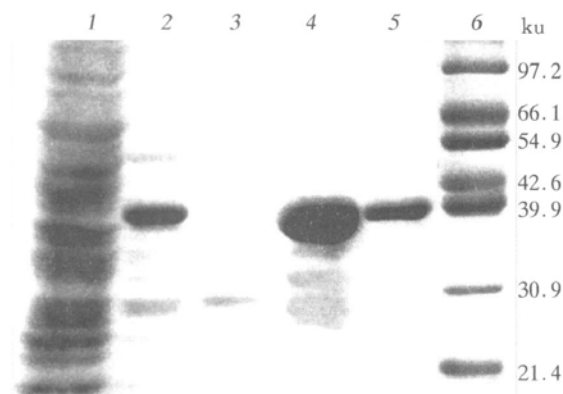


Fig. 1 Expression and purification of GST-ATF2 fusion protein
1: control; 2: bacteria induced by IPTG; 3: bound by Glutathione Sepharose 4B beads; 4: first eluate; 5: second eluate; 6: protein marker.

3.2 His-p38 MAPK 融合蛋白的表达和纯化

由图 2 可见, $6 \times \text{His-p38}$ 重组质粒 (载体为 pET14b) 转化的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株经 IPTG 诱导后, His-p38 MAPK 融合蛋白表达比对照显著增加, 经 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖珠亲和层析后, His-p38 MAPK 得到显著纯化, 其分子质量约为 42 ku.

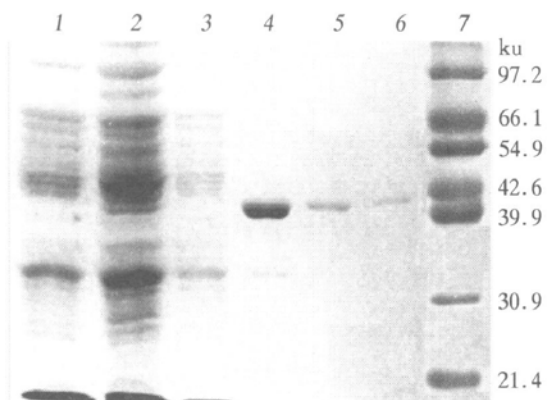


Fig. 2 Expression and purification of His-p38 fusion protein
1: control; 2: bacteria induced by IPTG; 3: bound by Ni^{2+} -NTA-agarose beads; 4: first eluate; 5: second eluate; 6: third eluate; 7: protein marker.

3.3 p38 MAPK 活性的剂量效应关系

为验证建立的放射自显影激酶活性测定方法的可靠性, 首先检测了有活性的 His-p38 MAPK 剂量反应关系, 所用 His-p38 MAPK 的量分别为 0.0~12.0 μg , 底物 ATF2 均为 10 μg . 由图 3 可见 p38 MAPK 对 ATF2 的磷酸化呈现显著的剂量反应关系, 并具有较高的灵敏性. 表明所建的激酶活性测定方法可靠性好, 可用于细胞内激酶活性的测定.

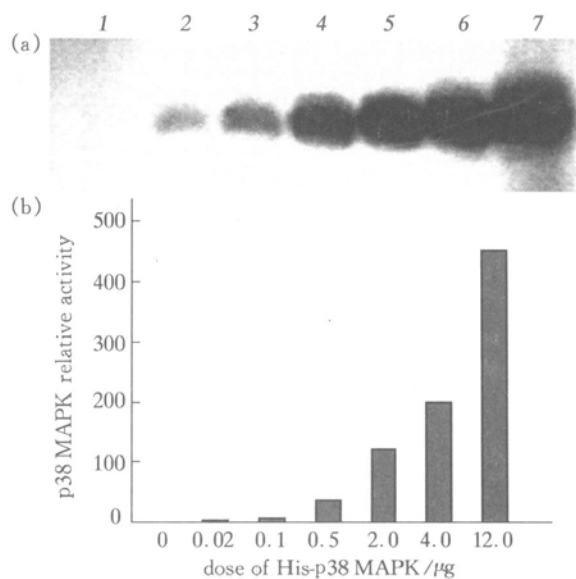


Fig. 3 Relation between dose of p38 MAPK and its activity

(a) autoradiograph picture of activity of p38 MAPK. 1~7: doses of His-p38 MAPK were respectively 0.0, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 4.0, 12.0 μg . (b) bar chart of radioactive intensity coming from scanning autoradiograph picture of activity of p38 MAPK.

3.4 离体下 SB203580 对 p38 MAPK 的抑制效应

离体下, p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 可抑制 p38 MAPK 活性 (图 4). SB203580 浓度为

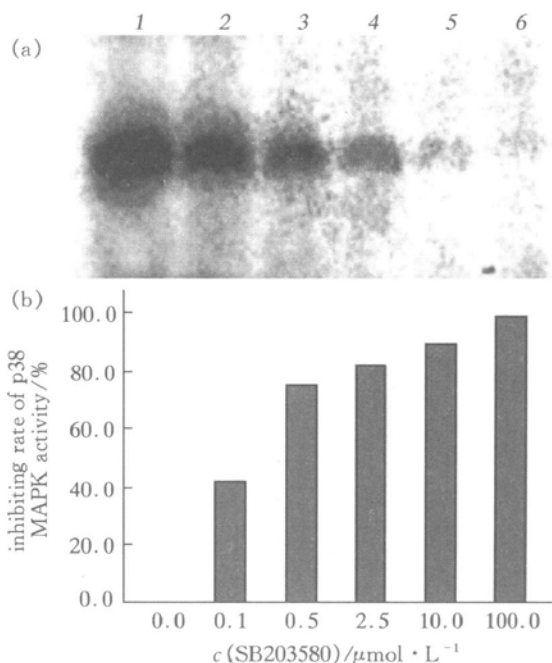


Fig. 4 Inhibiting role of SB203580 on activity of p38 MAPK in vitro

(a) autoradiograph picture of activity of p38 MAPK. 1~6: doses of SB203580 were respectively 0.0, 0.1, 0.5, 2.5, 10.0, 100.0 $\mu\text{mol/L}$. (b) bar chart of inhibiting intensity of SB203580 coming from scanning autoradiograph picture of activity of p38 MAPK.

0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对 p38 MAPK 有明显抑制作用; 当浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制作用显著增强; 当浓度为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, p38 MAPK 活性几乎完全被抑制. 表明建立的激酶测定方法, 能准确反映出 p38 MAPK 特异性抑制剂对 p38 MAPK 活性的影响.

3.5 LPS 对内皮细胞中 p38 MAPK 活性影响

内皮细胞在脂多糖 (LPS) 刺激 15 min 后, p38 MAPK 活性即有增高, 30~60 min 达高峰, 120 min 后活性逐渐下降 (图 5).

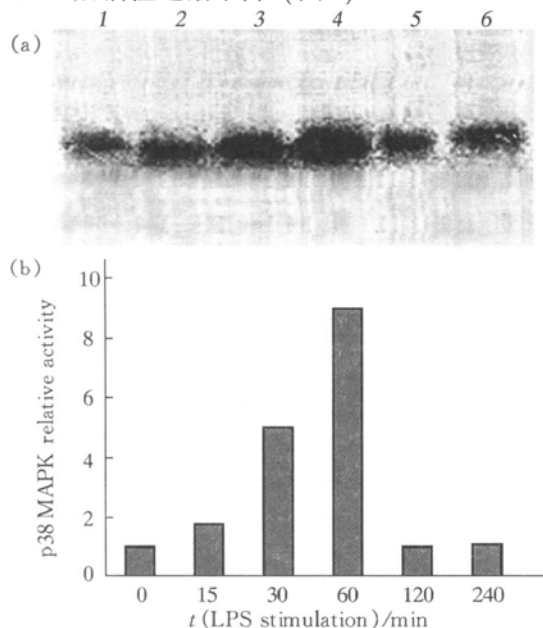


Fig. 5 Effect of LPS on activity of p38 MAPK of endothelial cells

(a) autoradiograph picture of activity of p38 MAPK, 1~6: times of LPS stimulation were respectively 0, 15, 30, 60, 120, 240 min.
(b) bar chart of radioactive intensity coming from scanning autoradiograph picture of activity of p38 MAPK.

4 讨 论

细胞中 p38 MAPK 信号转导通路可被 LPS 等激活. LPS 对 p38 MAPK 的激活也是通过一种有序的激酶级联 (MAPKKK → MAPKK → MAPK) 而激活的过程. p38 MAPK 对底物的选择性, 则取决于激酶亚结构域 VII 和 VIII 之间的 Loop 12 (L12) 环的氨基酸序列和长度, 以及双位点磷酸化基团 Thr-Gly-Tyr^[1]. ATF2 是 p38 MAPK 底物, 也是 ATF/CREB 转录因子家族的成员, 具有碱性的亮氨酸拉链 DNA 结合结构域, p38 MAPK 能磷酸化 ATF2 的氨基端激活结构域中的 Thr-69 和 Thr-71, 使其转录活性增加^[2]. 离体下 p38 MAPK 同样磷

酸化 ATF2, 并可将 γ -³²P-ATP 中的 ³²P 转移到 ATF2 的相应氨基酸残基上, 这种特性提供了应用放射自显影技术测定 p38 MAPK 活性的可能性. 为了判定本方法的准确性, 进行了以下三方面的试验.

a. p38 MAPK 激酶反应体系量效关系测定: 离体研究表明, 激酶反应中有活性 p38 MAPK 的量与 ATF2 融合蛋白的磷酸化程度, 呈现显著的剂量反应关系, 表明方法能用于评价细胞中内源性 p38 MAPK 的激活情况.

b. 特异性抑制剂 SB203580 作用后 p38 MAPK 活性变化: 实验证明方法能准确反映抑制剂对 p38 MAPK 活性的影响. 离体下, p38 MAPK 的活性可被其特异性抑制剂 SB203580 显著抑制. SB203580 作为一种细胞可通透的分子, 同样也抑制细胞内的 p38 MAPK 活性. 有研究认为 SB203580 同 ATP 竞争结合 p38 MAPK 上的 ATP 结合位点, 可能是其发挥抑制作用的机制. p38 MAPK 具有三个 ATP 结合位点, 分别是 Thr-106、Met-109、Ala-157, 其中 Thr-106 决定了 p38 MAPK 抑制剂的特异性, Met-109 决定了抑制剂的结合亲和力^[3]. 此外, SB203580 等对 p38 MAPK 的抑制作用也取决于 Thr-106、His-107、Leu-108 三个氨基酸的协同作用, 三者被 Met、Pro、Phe 取代后, SB203580 的竞争性抑制作用显著降低. 而取代其中的任一个, 只能部分地降低 SB203580 的抑制作用^[4]. 此外, SB203580 等对有活性和无活性 p38 MAPK 有同样的亲和力, 而抑制剂只与 ATP 竞争结合 p38 MAPK 的活性形式, 但 SB203580 等可抑制刺激所诱导的 p38 MAPK 的 Thr-Gly-Tyr 基团的磷酸化, 提示 SB203580 阻断 p38 MAPK 的活性, 除了通过与 ATP 竞争结合位点外, 还可能通过结合 p38 MAPK 的非活性形式, 减少 p38 MAPK 的激活比率^[5].

c. LPS 对内皮细胞中 p38 MAPK 的激活: 实验证明方法较好地反映 LPS 刺激内皮细胞后, p38 MAPK 活性的变化. 从 LPS 刺激的血管内皮细胞中, 免疫沉淀出来的 p38 MAPK 的活性与 LPS 的刺激时间具有明显的依赖性. 在 LPS 刺激 15 min 后, 细胞内 p38 MAPK 的活性即有明显的增加, 在 30~60 min 达到高峰, 之后显著下降. 表明内皮细胞中 p38 MAPK 的激活是一个较短暂的过程, p38 MAPK 所引起的较长期生物学效应, 可能有赖于所激活的下游信号分子的作用, 其中包括转录因

子的作用。

在放射自显影激酶活性测定方法的建立中, 被认为比较困难的是激酶及其特异性底物的表达纯化。通过查阅文献, 对激酶活性结构域以及底物的磷酸化位点进行分析, 可自行克隆并表达出所需的激酶活性形式以及特异性的底物。在蛋白质提纯时, 应准确使用一些蛋白酶抑制剂和低温操作以防止蛋白质降解。在激酶反应过程中, 应充分摇动, 使酶和底物接触均匀, 以利于反应。在电泳分离阶段, 尽量避免样品漏到加样孔外, 外漏的 γ - ^{32}P -ATP 在电泳时会逐渐进入胶内, 增加检测的本底, 影响对样品条带的观察。由于游离的 γ - ^{32}P -ATP 在指示剂溴酚蓝附近, 应把溴酚蓝带切除干净, 避免同位素污染凝胶, 并用自来水充分冲洗凝胶, 以降低本底。由于 ^{32}P 的穿透能力较弱, 在进行接触同位素操作时, 应用 8 mm 的透明有机玻璃板足以达到防护眼睛等重要器官的目的, 研究者完全可以在有机玻璃板的防护下大胆操作。

参 考 文 献

- 1 Jiang Y, Li Z, Schwarz E M, *et al.* Structure-function studies of p38 mitogen-activated protein kinase. Loop 12 influences substrate specificity and autophosphorylation, but not upstream kinase selection. *J Biol Chem*, 1997, **272** (17): 11096~ 11102
- 2 Raingeaud J, Gupta S, Rogers J S, *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, 1995, **270** (13): 7420~ 7426
- 3 Lisnock J, Tebben A, Frantz B, *et al.* Molecular basis for p38 protein kinase inhibitor specificity. *Biochemistry*, 1998, **37** (47): 16573~ 16581
- 4 Gum R J, McLaughlin M M, Kumar S, *et al.* Acquisition of sensitivity of stress activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem*, 1998, **273** (25): 15605~ 15610
- 5 Frantz B, Klatt T, Pang M, *et al.* The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry*, 1998, **37** (39): 13846~ 13853

Establishment and Application of Autoradiograph Assay of p38 MAPK Activity*

YAN Wen-Sheng, JIANG Yong, HUANG Qiao-Bing, ZHAO Ke-Sen**

(Department of Pathophysiology, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Autoradiograph assay of p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) activity was established, and applied in measurement of p38 MAPK activity of vascular endothelial cell stimulated by lipopolysaccharide (LPS). Results showed that autoradiograph assay possessed specificity and sensitivity. Activity of p38 MAPK in endothelial cell treated by LPS was increased at 15 min, and reached maximum value during 30~ 60 min, then descended. It suggested that domestic laboratory completely had the ability to establish autoradiograph assay of kinase activity, and applied in study of signal transduction.

Key words p38 mitogen-activated protein kinase, autoradiograph assay of kinase activity, lipopolysaccharide, vascular endothelial cell

* This work was supported by a grant from Key Program of National Natural Science Foundation of China (39830400).

** Corresponding author. Tel: 86-20-85148232, E-mail: zhaoks@fimmu.edu.cn

Received: July 4, 2000 Accepted: August 23, 2000