

药物筛选及细胞学试验

采用均相化学发光激酶测定试剂盒测定更宽范围的丝氨酸，苏氨酸和酪氨酸激酶活性

竞争性结合测定已被发展成为检测一定范围内的丝氨酸，苏氨酸和酪氨酸激酶的活性的常用方法。基于酶片断互补的原理和后续的化学发光底物杂交，HiHunter激酶测定试剂盒所产生的信号可以通过高通量的成像系统测定也可以用普通的酶标仪测定。

介绍：

人类的蛋白激酶参与了许多不同的细胞过程,比如信号传导和细胞周期。蛋白质磷酸化的精确控制是最基本的细胞行为,而通过激酶调控的各种信号已出现在各类疾病状态下,如癌症,动脉粥样硬化症,和炎症反应中的败血性休克。能够抑制蛋白激酶和磷酸化酶活性的抑制因子对开发治疗性的抗体是非常有用的。

HiHunter 激酶测定试剂盒采用酶片断互补技术 (EFC) 的竞争性结合实验,能灵敏简单的测定一定范围内的生物目标。基于专利的激酶和亚基对,该试剂盒能提供更加灵敏而均相的方法检测覆盖了激酶组 80% 的宽范围 丝氨酸,苏氨酸和酪氨酸激酶。

HiHunter 激酶测定试剂盒原理

EFC 技术是基于两个非活性的 β - 半乳糖苷酶 (B-gal) 片段的重组。酶供体 (ED) 片断和酶受体 (EA) 片段的互补形成了有活性的 B-gal。随后的发光底物会产生信号,该信号可以通过读板仪和成像系统如 LEADseeker™ 读取。

HiHunter 激酶测定试剂盒利用一个底物偶联的磷酸化酶供体和酶受体联接 形成了有活性的酶,该供体还可被磷酸化的底物抗体识别。在实验中,磷酸化的底物抗体通过优化滴定结合上磷酸化酶供体的底物偶联物从而抑制了酶的形成。但是,当存在来至于一个酶反应的磷酸化底物,该底物会结合抗体而未结合的磷酸化酶供体的底物偶联物就可以自由结合酶受体从而形成有活性的酶。接下来的通过 B-gal 作用的化学发光底物水解产生的阳性信号正比于激酶产生的磷酸化肽段的浓度。

开发的每个 HiHunter 激酶测定试剂盒具备专利的酶抗体

和相应的底物可测定宽范围的丝氨酸,苏氨酸和酪氨酸,适用不同的磷酸化激酶底物。表 1

Table 1. Kinase targets and associated substrate sequences.

Serial Kinase Name	Sequence of peptide substrate	Kinase Family
Crossble	SRPPYD-pH-PEDD	AGC Gyr III
PKC β -1/3	RRRERD-pH-RQKQER	AGC Gyr III
Wengble	LRRA-pH-LS	AGC Gyr III
Serble 2	PLRRLT-pS-VKQVQAN	CAMP Gyr II
Glycogen synthase-K62 peptide	RRRRLT-pS-VK	CAMP Gyr II
SRNAb	RRRRLA-pS-VK	CAMP Gyr II
ATF2	SRDQY-pH-RRRLR	CMGC
CHRE2b	RRRTRRQRRER-pH-RRRLRRR	CMGC Gyr III
Hydric basic protein	RRRRLTRG-pH-RRRTRR	CMGC Gyr III
Threonine kinase	Sequence of peptide substrate	
PKA For tyrosine kinases	EE-pH-EE	TK
PKC β 2	RRRRLDQY-pH-RRRLR	TK

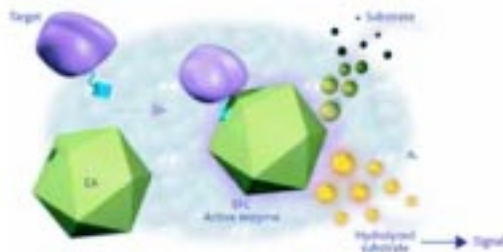


图 1 技术原理

实验设计

HiHunter激酶测定试剂盒由两种简单的试剂组成进行EFC检测,遵循酶反应。图 2

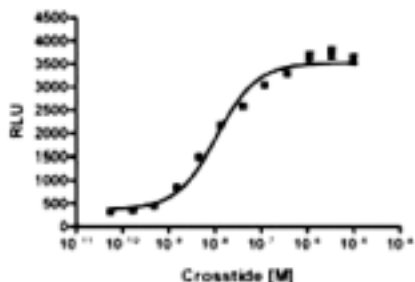


图 2 步骤

激酶反应由一个激酶底物,ATP 抗体,复合物,和星磷酸化相关的任何余因子组成。因为反应组分对每种激酶是特异性的,所以组分和孵育时间对每种激酶反应需优化。

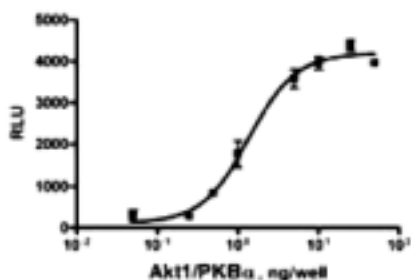
性能:

HiHunter 激酶测定试剂盒生成的激酶曲线比背景高出 7-10 倍, 具有高的严谨性的实验 (z 因子 >0.7)。一个标准的曲线会显示化学发光信号浓度依赖的递增。



图三 LEADseeker 成像系统显示的标准曲线, 磷酸化底物肽段

对激酶 Akt1/PKB 的 AGC Group III, 25uM 的底物, ATP100uM, 和 CaCL2 2mM 图 4



图四 Akt1/PKB 激酶活性, LEADseeker 成像系统成像

抑制钙/钙调素依赖的激酶活性, CaM 激酶 II 具有特定激酶抑制因子在图 5 描述。

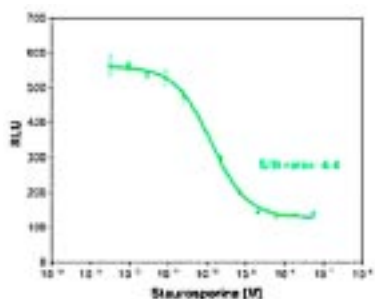
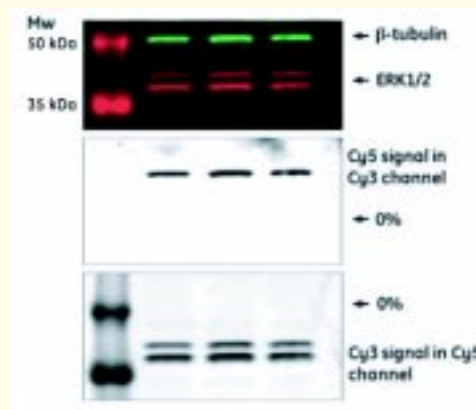


图 5 孢菌素抑制 CaM 激酶 II 活性曲线图

总结:

HiHunter 激酶测定试剂盒能灵敏特异性的监测更宽范围内的丝氨酸, 苏氨酸和酪氨酸的功能活性。非同位素并均相的形式使得操作自动化小型化, 也减少了化学发光信号被复合物的干扰。

(上接第 5 页)

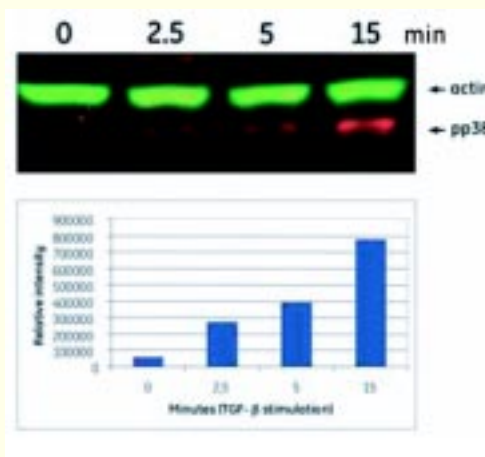


图三: T293 细胞株在 0,5 和 15 分钟时用 TGF- β , β -微管蛋白和 ERK1/ERK2 激活, 单克隆抗体 anti- β -tubulin 和 anti-mitogen 在膜 Hybond ECL 上检测。二级抗体是 ECL Plex, Typhoon 9410 上获取图像。错误信号显示在相反检测通道说明染料的交叉反应(%)。

结论:

蛋白质印迹实验是一项非常成熟的技术。普遍应用在化学发光, 例如 GE Healthcare 的 ECL 家族。作为该家族的新成员, ECL Plex 具有更宽的动态范围, 可以高灵敏度和特异性同时检测多个蛋白样品。这些特性对化学发光产品有了很好的补充, 提供了更精确的定量数据和更短的处理时间。CyDye 荧光技术也为储存和再扫描提供了更持久的信号。低丰度蛋白能有效地在细胞溶液和信号转到通路中被检测到。

参考文献



图四: 靶蛋白: 细胞株 T293 里的 phosphorylated p38(pp38)磷酸化蛋白和人肌动蛋白。TGF- β 刺激细胞株, 磷酸化后检测到所有目的蛋白。检测: Hybond-LFP 在 Typhoon9410 上检测初级抗体: 抗磷酸化 p38 MAP 激酶(Thr180/Tyr182)多抗和抗肌动蛋白单抗。二级抗体: ECL Plex Cy5 标记的山羊抗兔 IgG 和 ECL Plex Cy3 标记的山羊抗小鼠 IgGpp38 的相对定量值是相对于 anti-actin 总量计算的