基于荧光偏振的高灵敏度蛋白激酶活性分析

王志彬^a 张学晶^a 王愈聪^a 高金鹏^b 李正平^{*,a}

(^a 河北大学化学与环境科学学院 保定 071002)

(^b 陕西师范大学附属中学 西安 710062)

摘要 利用 TiO₂ 纳米棒与磷酸化肽的特异性相互作用, 基于荧光偏振检测, 建立了快速、简便的高灵敏度蛋白激酶活性分析方法. 在蛋白激酶催化作用下, 荧光标记的肽底物被磷酸化, 磷酸化的荧光肽通过磷酸基团特异性结合在 TiO₂ 纳米棒表面, 从而使底物肽上标记的荧光分子的旋转速率发生改变, 通过对荧光偏振度进行测量, 可实现蛋白激酶活性的定量检测, 该方法对蛋白激酶 A (PKA) 的检出限可达 0.0004 U·μL⁻¹. 此外, 该方法还成功用于 PKA 抑制剂 H-89 的检测, 在基于蛋白激酶抑制剂的靶向药物筛选方面具有很好的应用前景.

关键词 荧光偏振; 蛋白激酶 A; 磷酸化; TiO₂ 纳米棒; 抑制剂筛选

Ultrasensitive Detection of Protein Kinase Activity by Using the Fluorescence Polarization Technique

Wang, Zhibin^a Zhang, Xuejing^a Wang, Yucong^a Gao, Jinpeng^b Li, Zhengping^{*,a}

(^a College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)

(^b The High School Affiliated to Shaanxi Normal University, Xi'an 710062)

Abstract Protein phosphorylation by protein kinase plays a critical role in the process of cellular signal transduction, which is closely associated with many fundamental biological processes including cell growth and apoptosis. Aberrant states of protein kinase activities are involved in many diseases, such as diabetes, Alzheimer's disease and cancers. Moreover, protein kinase has now become one of the most important groups of drug targets. The screening of protein kinase inhibitors is becoming increasingly important in the targeted therapy. Therefore, rapid and sensitive detection of protein kinase activity is of great significance for better understanding the life process, clinical diagnosis as well as discovery of new targeted drugs. In this study, a simple, ultrasensitive and cost-effective assay is developed for detection of protein kinase activity by using fluorescence polarization technique based on the specific recognition ability of TiO₂ nanorods for kinase-induced fluorescent phosphopeptides. In the presence of protein kinase, the fluorescence-labeled substrate peptides can be phosphorylated with the catalysis of the protein kinase. Then the phosphopeptides can specifically bind to Ti⁴⁺ on the surface of the TiO₂ nanorods by means of phosphate groups, leading to remarkable change of rotation speed of the fluorophores, which subsequently results in the great increase of fluorescence polarization signal. By monitoring the fluorescence polarization signals, protein kinase A (PKA), a proof-of-concept kinase target, can be detected in the range of 0.0005~1.0 U·μL⁻¹ and the detection limit is estimated to be 0.0004 U·μL⁻¹, indicating that the proposed assay is one of the most sensitive assays for PKA activity detection. Furthermore, the proposed assay is also successfully applied to PKA inhibition assay by using H-89 as the model inhibitor of PKA. The IC₅₀ value (inhibitor concentration producing 50% inhibition) is determined as 135 nmol·L⁻¹, which is well consistent with that reported in the literatures. For the proposed assay, the TiO₂ nanorods are commercially available with low cost and can be used without any modification. The fluorescence polarization can be directly measured in the homogeneous solution. Therefore, the new strategy provides a simple detection procedure, easy readout and cost-effective manner for protein kinase assay.

Keywords fluorescence polarization; protein kinase A; phosphorylation; TiO₂ nanorods; screening of inhibitor

1 引言

在细胞信号转导过程中, 依赖于蛋白激酶的蛋白质磷酸化是一种重要的转录后调控机制, 它可以调节靶蛋白的活性进而调节相关基因的表达, 在细胞增殖、分化以及凋亡等生命过程中起着非常重要的作用^[1,2]. 异常

的磷酸化过程往往会导致各种疾病的产生, 因此检测蛋白激酶的活性对于生命科学研究及疾病诊断都具有重要意义. 蛋白激酶也是重要的靶向药物的作用靶点, 通过筛选蛋白激酶的抑制剂, 可以进行以蛋白激酶为靶点的新型药物研究.

* E-mail: lzpb@hbu.edu.cn; Tel.: 0312-5079403; Fax: 0312-5079403

Received September 28, 2013; published October 23, 2013.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91127035) and Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No. 20111301130001).

项目受国家自然科学基金(No. 91127035)和教育部博士点基金(No. 20111301130001)资助.

传统的蛋白激酶活性检测采用放射性分析方法^[3]. 由于放射性危害, 近年来蛋白激酶活性的非放射性分析方法得到了快速发展, 包括荧光分析^[4], 电化学分析^[5], 电致化学发光分析^[6], 质谱分析^[7], 表面等离子体共振^[8]等. 但这些分析方法一般需要多肽底物的固定化或分离步骤, 使分析过程操作繁琐. 蛋白激酶活性的荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 分析一般是荧光标记的多肽底物在蛋白激酶催化下磷酸化, 然后其磷酸基团特异性地与磷酸化多肽的抗体^[9]或者纳米粒子^[10]结合, 导致多肽上标记的荧光分子的旋转速率降低, 产生荧光偏振信号. 荧光偏振分析法不需要固定化或分离步骤, 直接在均相溶液中获得分析结果, 是目前最简便、快速的蛋白激酶活性分析方法. 磷酸化多肽的抗体制备困难, 价格昂贵, 且一种抗体只适用于一种或几种蛋白激酶活性的分析. 用于荧光偏振分析的纳米粒子, 需要在表面共价修饰配体, 使其络合高价金属离子, 通过金属离子与多肽上的磷酸基团发生作用.

本文利用商品化 TiO_2 纳米棒表面与底物肽上磷酸基团的特异性结合能力, 基于荧光偏振检测, 研究建立了高灵敏度的蛋白激酶活性分析方法. 该方法对蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 的检出限可低至 $0.0004 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 是目前最灵敏的检测方法之一, 并成功应用于 PKA 活性抑制剂的筛选.

2 结果与讨论

2.1 检测原理

荧光偏振的原理最早是由 Perrin^[11]在 1926 年提出的, 荧光物质在偏振光的激发下, 其发射出的偏振光强度与荧光物质的分子大小以及转动速度密切相关, 其偏振度表现为与分子大小呈正相关, 与其分子旋转速度呈负相关. 与单分子相比, 纳米粒子具有很大的体积, 当其与荧光分子结合, 使其分子旋转速度显著降低, 荧光偏振度大大增加.

TiO_2 纳米粒子表面的 Ti^{4+} 可以选择性地结合磷酸化多肽的磷酸基团, 所以 TiO_2 纳米粒子可用于选择性地分离富集磷酸化多肽. 最近, 刘宝红等^[12]利用磷酸化多肽与 TiO_2 纳米粒子表面的特异性相互作用, 建立了蛋白激酶活性的电化学分析方法. 我们课题组也利用 TiO_2 包覆的磁性微球分离富集荧光标记的磷酸化肽, 建立了蛋白激酶活性的荧光分析方法^[13]. 这些方法虽然取得了高灵敏度, 但都需要繁琐的操作. 本文直接利用商品化的 TiO_2 纳米棒, 提出了利用荧光偏振检测蛋白激酶活性的新方法. 方法原理如图 1 所示. 选取 PKA 为靶标, 其底物肽采用荧光素标记 (FITC-LRRASLG). 当 PKA 存在时, 底物肽中丝氨酸 (S) 残基将被磷酸化, 其磷酸基团能选择性地结合在 TiO_2 纳米棒表面, 使荧光分子的旋转速率大大降低, 其荧光偏振度大大增加; 而未磷酸化的底物肽不会结合在 TiO_2 纳米棒表面, 荧光

偏振度很低. 通过检测体系的荧光偏振程度, 即可实现 PKA 活性分析. 该方法简便、快捷, 不需要任何分离步骤; 商品化 TiO_2 纳米棒价廉易得, 大大降低了实验成本.

图 1 基于荧光偏振检测 PKA 活性的原理示意图

Figure 1 The principle of PKA activity detection based on the fluorescence polarization

2.2 TiO_2 纳米棒的表征

目前, TiO_2 纳米棒的制备工艺已经十分成熟, 且很多已实现商品化生产. 本文中选取从 Alfa-Aesar 购买的 TiO_2 纳米材料进行研究. 图 2 是该 TiO_2 纳米棒的透射电镜 (TEM) 照片. 从 TEM 照片中可以看到, 该 TiO_2 纳米材料呈短的纳米棒状, 棒的平均直径约为 15 nm 左右, 而纳米棒的长度在 50~100 nm 之间. 该 TiO_2 纳米棒在水及本文所用缓冲 (Tris-HCl, pH 7.4) 体系中分散性良好, 静置 8 h 无明显沉降现象, 表明该 TiO_2 纳米棒可用于均相荧光偏振分析.

图 2 TiO_2 纳米棒透射电镜图谱

Figure 2 TEM image of TiO_2 nanorods

2.3 实验条件的优化

为了获得蛋白激酶活性分析的高灵敏度和信噪比, 我们对 TiO_2 纳米棒的用量进行了优化. 固定底物肽终浓度为 $750 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 研究了 PKA 浓度为 $0.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时体系的荧光偏振度与相应空白荧光偏振度的比率值随 TiO_2 纳米棒浓度的变化. 结果如图 3 所示, 样品与空白的荧光偏振度比率在 TiO_2 纳米棒浓度为 $0.5 \sim 6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时随 TiO_2 纳米棒浓度增加而逐渐升高, 在 TiO_2 纳米棒浓度为 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时样品与空白的偏振度

比率最大,表明随着体系内 TiO_2 纳米棒的增多,结合在其表面的磷酸化肽也逐渐增多,因此,体系的荧光偏振度逐渐增强;继续增大 TiO_2 纳米棒浓度会使样品与空白的荧光偏振度比率值逐渐降低,可能是由于体系内 TiO_2 纳米棒浓度太大,其本身的散射会影响到荧光偏振度的检测.故我们选取其比率最大时的 TiO_2 纳米棒的浓度,即 $6.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为 TiO_2 纳米棒的最佳浓度.

图3 TiO_2 纳米棒浓度对荧光偏振比率(PKA 信号/空白信号)的影响, PKA: $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 底物肽: $750 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Figure 3 The influence of the TiO_2 nanorods concentration on the FP ratio of PKA to blank, PKA: $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, peptide: $750 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

另外,底物肽的浓度也是影响检测灵敏度的一个重要因素,我们固定 PKA 浓度为 $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, TiO_2 纳米棒浓度为 $6.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,对底物肽浓度进行了优化.结果如图4所示,在底物肽浓度为 $100\sim 700 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,随着底物肽浓度的增加,由 PKA 催化生成的磷酸化肽增加,由此产生的荧光偏振度增加;当底物肽浓度大于 $700 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,荧光偏振度随底物肽浓度增加而逐渐降低.这是因为在 PKA 浓度固定的情况下,随着底物肽量的增加,未被磷酸化的底物肽的量会逐渐增多,即低

图4 底物肽的浓度对荧光偏振比率(PKA 信号/空白信号)的影响, PKA: $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, TiO_2 纳米棒: $6.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Figure 4 The effect of the peptide concentration on the FP ratio of PKA to blank, PKA: $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, TiO_2 nanorods: $6.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

偏振度的荧光强度增加,造成体系荧光偏振度的降低.在底物肽浓度为 $700 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $0.5 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ PKA 所产生的荧光偏振度与相应空白体系荧光偏振度的比率值达到最大,因此本文选取 $700 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为底物肽的最佳浓度.

2.4 PKA 分析结果

在优化的实验条件下,分别测量了 PKA 浓度为 0, 0.0005, 0.001, 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时体系的荧光偏振度值,其结果如图5所示.从图中可以看到,在 PKA 浓度为 $0.0005\sim 1 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 范围内,随着 PKA 浓度的逐渐增加,体系的荧光偏振度逐渐增强,其后再增加 PKA 的量,体系的荧光偏振度没有明显的变化.可能是由于在高浓度的 PKA 存在的情况下,大量底物肽被磷酸化,而 TiO_2 纳米棒结合磷酸化肽能力有限,故其荧光偏振度不再明显增强.因此,该蛋白激酶活性分析体系的检测范围是 $0.0005\sim 1 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,其最低检出限为 $0.0004 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (3σ , $n=11$).在目前已报道的 PKA 活性检测方法中,利用纳米粒子信号放大的电化学检测方法和荧光检测方法^[12,13]是目前最灵敏的检测方法之一,该方法对 PKA 的检出限分别为 $0.0002 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $0.0001 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,表明本文所建立方法的灵敏度与这些已有方法灵敏度相当,但与这些方法相比,本文方法无需任何分离及洗涤步骤,操作简单快捷,因此在蛋白激酶检测方面有明显的优势.

图5 荧光偏振度与 PKA 浓度的关系

Figure 5 The relationship between fluorescence polarization and PKA concentration

2.5 PKA 抑制剂检测

以蛋白激酶为靶点,筛选对特定激酶活性有显著抑制作用的抑制剂,是目前靶向药物研发中一个重要的研究方向^[14].为了验证本文所建立方法在激酶抑制剂筛选方面的应用,我们以对 PKA 有强抑制作用的 H-89 (N -[2-(p -溴苯丙烯盐基氨基)乙基]-5-异喹啉磺酰胺, N -[2-(p -Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide)为模式化合物^[15],利用我们所建立的方法,检

测了 H-89 对 PKA 活性的抑制作用。

固定 PKA 浓度为 $0.2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 然后分别加入不同浓度的 H-89 抑制剂, 其浓度依次为 0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1×10^3 , 2×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , $5 \times 10^4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 测量相应体系的荧光偏振度, 其结果如图 6 所示。从图 6a 可以看出, 随着体系中 H-89 浓度的逐渐增加, PKA 活性逐渐降低, 体系的荧光偏振度逐渐降低, 表明本文所建立方法可用于蛋白激酶抑制剂的筛选。从图 6b 所示结果可计算出 H-89 的 IC_{50} (抑制 PKA 活性 50% 时的抑制剂浓度) 为 $135 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献报道值相符合^[16,17]。

图 6 (a) 不同浓度的 H-89 抑制剂对 PKA 的抑制作用; (b) 对 H-89 抑制剂浓度取对数后的拟合曲线

Figure 6 (a) The inhibition of PKA activity in the presence of different concentrations of H-89; (b) The plot between the fluorescence polarization and the logarithm of H-89 concentrations

3 结论

基于 TiO_2 纳米棒与磷酸化肽的特异性相互作用, 我们建立了一种均相溶液中高灵敏度检测蛋白激酶活性的荧光偏振分析方法, 该方法操作简单方便、快速, 无需任何洗涤、分离等操作步骤, 且具有费用低廉的优势, 为检测蛋白激酶活性及与之密切相关的细胞信号转导研究提供了一种新的检测技术。另外, 实验结果也表明该方法适合于蛋白激酶抑制剂(新型靶向药物)的筛选。

4 实验部分

4.1 试剂与仪器

荧光标记的 PKA 底物肽 (FITC-LRRASLG) 由吉尔生化上海有限公司合成, cAMP 依赖的蛋白激酶 A 购置于 NEB 公司, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ATP 水溶液购置于生工生物工程(上海)股份有限公司, PKA 抑制剂 H-89 购置于 EMD Bioscience (Calbiochem, CA), TiO_2 水分散液购置于阿法埃莎(天津)化学有限公司。本实验用水均为灭菌水。

实验主要仪器有 F-4500 荧光分光光度计(Hitachi, 日本), WH-861 型快速涡旋混合器(华利达公司, 中国), CHB-100 型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司, 中国)。

4.2 PKA 活性检测

4.2.1 底物肽磷酸化

在终体积为 $100 \mu\text{L}$ 的反应体系中, 分别加入适量的底物肽, ATP(底物肽与 ATP 比例为 1:2)以及 PKA 反应缓冲溶液, 再加入不同浓度的 PKA, 恒温 30°C 条件下反应 1 h。

4.2.2 荧光偏振检测

将上述磷酸化后的反应液与 $100 \mu\text{L}$ 浓度为 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TiO_2 纳米棒分散液等体积混合, 放置 30 min, 然后进行荧光偏振检测分析, 荧光偏振度 $P = (I_{vv} - GI_{vh}) / (I_{vv} + GI_{vh})$ 。 I_{vv} 为起偏器和检偏器均为垂直取向时测得的荧光强度, I_{vh} 为起偏器取向垂直而检偏器取向水平时测得的荧光强度。由于单色器和光电倍增管对垂直和水平偏振光的敏感度不同, 因而需要引入校正因子 G , G 为水平偏振光激发样品时, 仪器对垂直偏振光的透射效率与对水平光透射效率之比, 定义为 $G = I_{hv} / I_{hh}$, I_{hv} 为起偏器取向平行而检偏器取向垂直时测得的荧光强度, I_{hh} 为起偏器和检偏器均为平行取向时测得的荧光强度。

4.3 PKA 抑制剂实验

在检测 PKA 抑制剂实验中, 固定 PKA 浓度为 $0.2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 在其中分别加入不同量的 PKA 抑制剂 H-89, 然后进行磷酸化反应。待磷酸化反应结束后, 加入等体积的 TiO_2 纳米棒分散液, 放置 30 min, 然后进行荧光偏振检测。

References

- [1] Hunter, T. *Cell* **2000**, *100*, 113.
- [2] Franklin, R. A.; McCubrey, J. A. *Leukemia* **2000**, *14*, 2019.
- [3] Houseman, B. T.; Huh, J. H.; Kron, S. J.; Mrksich, M. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 270.
- [4] Li, Y. J.; Xie, W. H.; Fang, G. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 2049.
- [5] Wang, C. L.; Wei, L. Y.; Yuan, C. J.; Hwang, K. C. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 971.
- [6] Xu, S. J.; Liu, Y.; Wang, T. H.; Li, J. H. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9566.
- [7] Yu, Y. H.; Anjum, R.; Kubota, K.; Rush, J.; Villen, J.; Gygi, S. P.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11606.
- [8] Yoshida, T.; Sato, M.; Ozawa, T.; Umezawa, Y. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 6.
- [9] Wu, J. J.; Yarwood, D. R.; Pham, Q.; Sills, M. A. *J. Biomol. Screening* **2000**, *5*, 23.
- [10] Gaudet, E. A.; Huang, K. S.; Zhang, Y.; Huang, W.; Mark, D.; Sportsman, J. R. *J. Biomol. Screening* **2003**, *8*, 164.
- [11] Perrin, F. *J. Phys. Radium*. **1926**, *7*, 390.
- [12] Ji, J.; Yang, H.; Liu, Y.; Chen, H.; Kong, J. L.; Liu, B. H. *Chem. Commun.* **2009**, 1508.
- [13] Bai, J.; Zhao, Y. J.; Wang, Z. B.; Liu, C. H.; Wang, Y. C.; Li, Z. P. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 4813.
- [14] Wang, Y.; Long, Y.-Q. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 1595. (王勇, 龙亚秋, 有机化学, **2011**, *31*, 1595.)
- [15] Marunaka, Y.; Niisato, N. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 1083.
- [16] Davies, S. P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2000**, *351*, 95.
- [17] Sazonova, O. V.; Blishchenko, E. Y.; Tolmazova, A. G.; Khachin, D. P.; Leontiev, K. V.; Karelin, A. A.; Ivanov, V. T. *FEBS J.* **2007**, *274*, 474.

(Cheng, F.)