

蛋白质磷酸化活性分析

Protein Phosphorylation Activity Assay

马海港，唐宁，袁猛*

作物遗传改良国家重点实验室，华中农业大学，武汉

*通讯作者邮箱: myuan@mail.hzau.edu.cn

引用格式：马海港，唐宁，袁猛. (2018). 蛋白质磷酸化活性分析. *Bio-101* e1010129. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010129.

How to cite: Ma, H. G., Tang, N. and Yuan, M. (2018). Protein phosphorylation activity assay. *Bio-101* e1010129. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010129. (in Chinese)

实验原理：蛋白质磷酸化指的是由蛋白质激酶催化的把三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)或三磷酸鸟苷(Guanosine triphosphate, GTP)γ 位的磷酸基团转移到底物蛋白质氨基酸残基(如丝氨酸、苏氨酸等)上的过程。本实验以放射性同位素标记的[γ-³²P]ATP 作为磷酸基团的供体，以牛髓磷脂碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)作为蛋白质磷酸化的底物(即磷酸基团的受体)，与待测蛋白质共同反应，之后通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离，用放射自显影或磷屏检测磷酸化蛋白质，从而判断待测蛋白质是否具有磷酸化活性或自磷酸化活性。

实验目的：检测蛋白质是否具有磷酸化活性或自磷酸化活性。

关键词：磷酸化，激酶，同位素，三磷酸腺苷

材料与试剂

1. 滤纸
2. 保鲜膜
3. 氯化镁 (Magnesium chloride, MgCl₂) (Sigma, USA, catalog number: 449172)
4. 氯化锰 (Manganese(II) chloride, MnCl₂) (Sigma, USA, catalog number: 450995)
5. 牛髓磷脂碱性蛋白 (Myelin Basic Protein bovine, MBP) (Sigma, USA, catalog number: M1891)
6. 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP) (Sigma, USA, catalog number: A2383)

7. β -巯基乙醇 (2-Mercaptoethanol) (Fluka, USA, catalog number: 63690)
8. Tris (ANGUS chemical company, USA, catalog number: 77-86-1)
9. 二硫苏糖醇 (Dithiothreitol, DTT) (上海生工, 中国, catalog number: DB0058)
10. 考马斯亮蓝 R-250(Coomassie Brilliant Blue) (上海生工, 中国, catalog number: CB0037)
11. 十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) (上海生工, 中国, catalog number: SB0485)
12. 溴酚蓝 (Bromophenol blue) (上海生工, 中国, catalog number: B0449)
13. 甘氨酸 (Glycine) (上海生工, 中国, catalog number: G0167)
14. 盐酸 (Hydrochloric acid, HCl) (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
15. 甘油 (Glycerol) (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
16. 异丙醇 (Isopropyl alcohol) (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
17. 冰醋酸 (Acetic acid) (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
18. 95%乙醇(Ethanol) (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
19. Kinase Buffer (见溶液配方)
20. 5x SDS-PAGE Loading Buffer (见溶液配方)
21. 5x Tris-Glycine Buffer (见溶液配方)
22. 考马斯亮蓝 R-250 染色液 (见溶液配方)
23. 脱色液(见溶液配方)

仪器设备

1. Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, USA)
2. 盖革计数器
3. 移液枪
4. 暗夹

实验步骤

1. 预先在冰上配制 kinase buffer (溶液配方 1);
2. 加入 1-5 μ g 待测蛋白和 1-5 μ g MBP (检测待测蛋白是否具有自磷酸化活性时, 不添加 MBP) 至上述缓冲液中, 使终体积为 20 μ l;

3. 室温 (或置 26 °C 水浴中) 反应 30 min;
4. 加入 5 μ l 5x SDS-PAGE loading buffer (溶液配方 2), 75 °C 加热 5-10 min;
5. 冷却至室温;
6. 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 待染料线距离凝胶底部 1-2 cm 时停止电泳;
7. 用塑料铲板将浓缩胶及染料线之下的凝胶 (包含染料线) 切下丢弃, 剩余凝胶置于蒸馏水中漂洗掉表面的 SDS, 然后将凝胶置于滤纸上吸干水分, 用保鲜膜将凝胶包好;
8. 在暗室中进行下列操作: 将已经用保鲜膜包好的凝胶置于暗夹中, 用 X-光片覆盖于凝胶上, 扣好暗夹并将暗夹置于避光处 (如抽屉中) 3-5 h;
9. 在暗室中将 X-光片显影并定影, 之后用考马斯亮蓝 R-250 染色液对凝胶染色并用脱色液脱色;
10. 扫描或拍照 X-光片及脱色后的凝胶, 对结果进行分析。

注意事项

1. 对于某些对特殊离子具有依赖性的蛋白激酶 (如钙离子依赖性蛋白激酶), 应对 kinase buffer 中的成分进行调整。
2. 对于某些对温度敏感的蛋白激酶, 应调整步骤 3 中的反应温度。
3. 步骤 4 中避免加热温度过高或时间过长, 否则离心管盖容易冲开, 造成管内液体飞溅, 从而造成同位素污染事故。
4. 放射性同位素操作应在规范的专用操作室内进行; 含放射性同位素的废弃物 (废纸、废液等) 应按规定进行规范处理。
5. 尽量避免待测蛋白在制备过程中活性受到损害。

溶液配方

1. Kinase Buffer
 - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5
 - 10 mM $MgCl_2$
 - 10 mM $MnCl_2$
 - 1 mM DTT
 - 0.2 mM ATP

5 μ Ci [γ - 32 P]ATP

该缓冲液于冰上配制，现配现用，不可长久保存。

2. 5x SDS-PAGE Loading Buffer

250 mM Tris-HCl, pH 6.8

10% (w/v) SDS

0.5% (w/v) Bromophenol Blue

50% (v/v) Glycerol

用前加入 5% (v/v) β -巯基乙醇或 50 mM DTT，加入 β -巯基乙醇或 DTT 的 loading buffer 可在室温下放置一个月。

3. 5x Tris-Glycine Buffer

0.125 M Tris

1.25 M Glycine

0.5% (w/v) SDS

4. 考马斯亮蓝 R-250 染色液

0.1% (w/v) 考马斯亮蓝 R-250

25% (v/v) 异丙醇

10% (v/v) 冰醋酸

5. 脱色液

10% (v/v) 冰醋酸

5% (v/v) 乙醇