



(21)申请号 201610549785.7

(22)申请日 2016.07.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106053795 A

(43)申请公布日 2016.10.26

(73)专利权人 湖南天合生物技术有限公司

地址 410000 湖南省长沙市经济技术开发区
盼盼路9号

(72)发明人 郝秀娟 周敏

(74)专利代理机构 长沙市融智专利事务所

43114

代理人 袁靖

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 105445464 A,2016.03.30,

CN 105296596 A,2016.02.03,

CN 104046682 A,2014.09.17,

CN 103954774 A,2014.07.30,

CN 104479022 A,2015.04.01,

仲月明等.“银杏类黄酮O甲基转移酶活性的高
效液相色谱分析.《食品工业科技》.2012,第33
卷(第8期),

审查员 李倩

权利要求书2页 说明书12页 附图1页

(54)发明名称

一种甲基转移酶活性实时测定方法及试剂
盒

(57)摘要

本发明公开了一种甲基转移酶活性实时测定方法及试剂盒。包括在一个反应体系内两个同时进行的反应:(1)在保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲体系中,加入含有甲基转移酶(MT)的样品、甲基供体和相应的底物或者直接在含有甲基转移酶的液态样品中加入S-腺苷蛋氨酸甲基供体和相应的底物进行反应以便产生S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)产物,底物为甲基的受体物质;(2)利用免疫学方法检测SAH的含量,来确定反应体系中甲基转移酶的活性。本发明把MT催化的生化反应与测定产物SAH的免疫反应同时进行,把这两个过程有机地结合起来,对于准确地测定分子性状极其不稳定的SAH尤其具有重大的意义。

1. 一种甲基转移酶活性实时测定方法, 其特征在于, 包括在一个反应体系内两个同时进行的反应: (1) 在保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲体系中, 加入含有甲基转移酶的样品、甲基供体和相应的底物或者直接在含有甲基转移酶的液态样品中加入SAM甲基供体和相应的底物, 进行反应以便产生S-腺苷同型半胱氨酸产物, 底物为甲基的接受体物质; (2) 利用免疫学方法检测SAH的含量, 来确定反应体系中甲基转移酶的活性;

利用包被抗原法和包被抗体法两种方式的竞争法测量S-腺苷同型半胱氨酸的含量;

1) 采用包被抗原法的具体步骤如下:

(1) 不同浓度标准品的配制: 取S-腺苷同型半胱氨酸标准品, 用缓冲液配制成不同浓度的标准曲线样品;

(2) 在包被有蛋白-SAH偶联物或多聚体-SAH偶联物的微孔板中, 加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的抗S-腺苷同型半胱氨酸单克隆抗体, 含有S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶的样品及与待测甲基转移酶相应的甲基接受体物质的缓冲液体系; 如果是液态样品, 则直接加入S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶的样品及与待测甲基转移酶相应的甲基接受体物质; 标准曲线孔中加入配制好的不同浓度梯度的SAH标准品; 混匀后反应, 洗板;

(3) 加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的底物, 显色, 加入终止液终止反应, 在酶标仪上选择适当波长读取每孔的吸光度读数光密度值;

(4) 在同一酶联板中用配制的一系列已知量的SAH标准品, 据其光密度值与已知标准品浓度获得曲线方程, 再将样本光密度值代入方程求得其对应的反应产物SAH的生成量;

(5) 根据含有甲基转移酶的样品在单位时间内催化生成产物SAH的浓度来计算甲基转移酶的活性;

缓冲液是包括钾离子浓度范围在25-200mM, BSA添加浓度在0.1%-0.9%, pH范围为7.0-8.5的Tris或PB缓冲系统;

缓冲液配制的用于制作标准曲线的不同浓度的标准品浓度分别为0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10 μ M;

液态样品或者缓冲液中甲基供体加入后的浓度范围为10-30 μ M, 底物加入后的浓度范围为10-60 μ M; 加入每个微孔的缓冲液体系或者液态样品的体积为50 μ l, 稀释后的示踪物标记的抗体的体积为50 μ l;

反应时间和温度分别为37 $^{\circ}$ C和20分钟;

2) 包被抗体法: 先将羊或兔抗鼠IgG包被的微孔板中加入抗SAH抗体孵育, 或者直接包被抗SAH抗体, 洗板; 加入示踪物标记的SAH抗原, 再加入待检抗原, 待检抗原即生化反应产生的产物SAH, 待检抗原与示踪物标记的SAH竞争包被在酶联板上的抗SAH特异性抗体, 孵育洗板; 加入底物显色, 在测定过程中, 用配制的一系列梯度已知量的SAH作为标准品, 制作标准曲线。

2. 根据权利要求1所述的甲基转移酶活性实时测定方法, 其特征在于, 采用SAH抗原的类似物替代SAH抗原进行偶联或者示踪物标记。

3. 根据权利要求1所述的甲基转移酶活性实时测定方法, 其特征在于, 缓冲液是包括钾离子浓度为100mM, BSA添加浓度0.1%, pH为7.8的PB缓冲系统。

4. 根据权利要求1所述的甲基转移酶活性实时测定方法, 其特征在于, 液态样品或者缓

冲液中甲基供体加入后的浓度20 μ M,底物加入后的浓度20 μ M。

5.根据权利要求1所述的甲基转移酶活性实时测定方法,其特征在于,含有甲基转移酶的样品来源于基因工程表达的产物、生物组织细胞内被纯化出的样品、组织细胞内的甲基转移酶,生物体液或组织细胞培养液;生物体液为血液,血浆,血清,唾液,尿液,脑脊液,腹腔或胸腔渗出液,组织液。

6.权利要求1-5任一项所述的甲基转移酶活性实时测定方法配套的试剂盒,其特征在于,包括:包被有抗S-腺苷同型半胱氨酸抗体或S-腺苷同型半胱氨酸抗原的微孔板;示踪物标记的抗S-腺苷同型半胱氨酸抗体或示踪物标记的S-腺苷同型半胱氨酸抗原;S-腺苷同型半胱氨酸标准品;保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲液、S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶相应的甲基受体物质;阳性质控品甲基转移酶;示踪物检测系统。

一种甲基转移酶活性实时测定方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及甲基转移酶检测技术领域,具体涉及一类以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶生物学活性实时测定方法及检测试剂盒。

背景技术

[0002] 甲基转移酶(Methyltransferase,MT)是一类催化甲基化反应的酶,一般以S-腺苷蛋氨酸(S-Adenosyl Methionine,SAM)作为甲基供体。甲基化反应广泛存在于生物体内,他们的作用底物范围几乎囊括了细胞内所有生物活性分子,包括核酸、蛋白质、多糖、脂类以及诸多小分子,因此许多重要的生理环节如基因表达的抑制或关闭、DNA损伤的修复,以及微生物、动植物体内生理过程中间产物的合成与降解反应等都涉及到MT的调控作用。

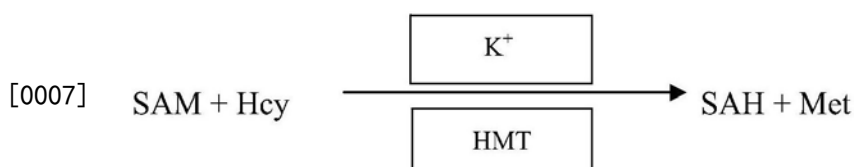
[0003] 按照目前的研究甲基转移酶可分为两类:遗传物质甲基转移酶和非遗传物质甲基转移酶。遗传物质甲基转移酶催化遗传物质胞嘧啶生理性的甲基化和由诱变物质导致的作为遗传物质附加体的甲基化。催化胞嘧啶甲基化的MT已经发现有6种,其中DNA甲基转移酶(DNA Methyltransferase,Dnmt)Dnmt1,Dnmt2,Dnmt3为哺乳动物的DNA甲基转移酶。MT1、MT3则是存在于植物体内的同源化甲基转移酶,此外染色质甲基转移酶(Chromomethylase,CMT)是植物所特有的一种MT。催化非遗传物质的甲基转移酶种类非常多,从参与染色体的形成到激素的合成都与其有一定的关联,其作用的底物非常广泛,包括激素类、蛋白质残基、黄酮、叶绿素、无机砷、磷酸甘油酯类等,表1中列举了目前研究较多的催化非遗传物质的甲基转移酶。

[0004] 表1

[0005]

名称	作用底物	研究对象	研究内容
巯(硫)嘌呤甲基转移酶	硫唑嘌呤、6-巯嘌呤等嘌呤类药物	人	功能、基因多态性等
生育酚甲基转移酶	生育酚	植物	启动子、基因转化
儿茶酚-O-甲基转移酶	儿茶酚胺类化合物	人	基因多态性与疾病的关系
磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶	磷脂酰乙醇胺	人	表达与疾病
组蛋白甲基转移酶	组蛋白精氨酸或赖氨酸残基	人	肿瘤发生
蛋白精氨酸甲基转移酶I/II	蛋白精氨酸残基、髓磷脂碱性蛋白	人	种类、疾病的发生
甘氨酸-N-甲基转移酶	甘氨酸	鼠	神经干细胞的分化
黄嘌呤-N-甲基转移酶	7-甲基黄嘌呤	茶叶	基因克隆与序列分析
肌醇甲基转移酶	肌醇	烟草	与耐盐性的关系
苯基乙醇-N-甲基转移酶	肾上腺素胺	人	功能与活性位点
无机砷甲基转移酶	无机砷	鼠	表达与活性
白杨-O-甲基转移酶	C7-羟基类黄酮	植物	蛋白区域选择性
佛手酚-O-甲基转移酶	佛手酚	大阿米芹	底物特异性
查耳酮-O-甲基转移酶	2,4,4'-三羟基查耳酮	紫花苜蓿	晶体结构、作用底物
异黄酮-O-甲基转移酶	7-羟基大豆苷元	苜蓿属植物	功能
水稻-O-甲基转移酶	3-羟基类黄酮	水稻	基因克隆与功能鉴定
大豆-O-甲基转移酶	木犀草素、槲皮素	大豆	基因克隆与功能鉴定
咖啡酸-O-甲基转移酶	5-羟基松柏醇	植物	木质素合成
咖啡酰辅酶A甲基转移酶	咖啡酰辅酶A	苕麻	基因表达
羟基吲哚-O-甲基转移酶	N-乙酰羟基色胺	鸡	活性与功能
黄烷酮-O-甲基转移酶	柚皮素	植物	表达与功能鉴定
安息香酸羧基甲基转移酶	安息香酸	植物	晶体结构与机制
茉莉酸羧基甲基转移酶	茉莉酸	植物	晶体结构与机制
水杨酸羧基甲基转移酶	水杨酸	植物	晶体结构与机制
尿卟啉III甲基转移酶	尿卟啉原III	玉米	表达与功能鉴定
法尼酸-O-甲基转移酶	法尼酸	节肢动物、莎草	基因克隆与鉴定
保幼激素酸-O-甲基转移酶	保幼激素酸	节肢动物	基因克隆与功能鉴定

[0006] MT在体内催化SAM和底物,将甲基转移至底物并生成SAH(S-腺苷同型半胱氨酸)和甲基化物。以同型半胱氨酸甲基转移酶(Homocysteine Methyltransferase,HMT)为例,酶促反应如下:



[0008] SAM是生物体内最常见的中间代谢产物。在蛋氨酸循环中,首先必须活化Met,形成SAM,SAM把甲基提供给生命过程中重要物质如DNA,RNA,脂蛋白,激素,神经递质等后变成S-腺苷同型半胱氨酸(SAH),SAH脱去腺苷后生成同型半胱氨酸(Hcy),最后通过四氢叶酸提供的甲基,又变成Met。在肝脏中,蛋氨酸循环有个额外的功能,主要是在高蛋白或高蛋白饮食后,用以迅速清除血液中过高的蛋氨酸,最后通过同型半胱氨酸、半胱氨酸、胱硫醚、谷胱甘肽被转运到其它器官。

[0009] SAM是自然界中仅有的几个功能极其多样而重要的含硫的生物活性物质,是蛋氨酸循环中的关键物质,是人类至关重要的甲基化修饰过程中甲基的唯一供体。在转甲基、转硫、转氨丙基反应中有重要的地位。对于甲基化相关的细胞功能、多胺合成、调节蛋氨酸与同型半胱氨酸的比例等有直接的影响。在各种生命重要的代谢反应和细胞的增殖分化等有重要意义。研究表明,肝脏中维持一定浓度的SAM对于肝功能的发挥起着至关重要的作用。大约85%的甲基化反应和约50%的蛋氨酸代谢是在肝脏中进行的,不仅提示肝脏在调节血

液蛋氨酸水平有重要的作用,而且提示SAM在调控肝细胞再生,分化以及对各种因素(酒精,化学物质,辐射,病原微生物,病毒,寄生虫等)造成的肝细胞损伤的敏感性的重大意义。在甘氨酸N-甲基转移酶(GNMT)缺失的小鼠中,SAM水平上升,这两种情况下,小鼠出现肝癌的几率明显增加。

[0010] 编码依赖于SAM的甲基转移酶的基因占人类基因组的基因总数的1%。很多研究表明MT与其甲基底物在人体生命活动的不同阶段,如胚胎发生、发育、成长、分化、健康、疾病中起着至关重要的作用,就是因为SAM在蛋氨酸循环和一碳代谢中有非常重要的特殊作用,与人体新陈代谢状况直接相关。体内的SAM含量会因为年龄、性别、种族、体重、饮食、用药情况、健康和疾病状况而有所波动。鉴于这一特性,我们应该从SAM的合成和分解代谢两个方面来考察原因。因此,了解MT在不同情况下生物活性的高低对于我们研究许多至关重要的代谢与健康问题有很大的实际意义。

[0011] 目前有三种办法测定MT的活性:方法一:同位素示踪微量分析法。用同位素标记的SAM作为甲基供体,以目标酶的另一底物作为甲基受体,在固定条件下,测定单位时间内转移到另一底物上的同位素液闪每分计数值表示MT的相对活性;方法二:高压液相(HPLC)或质谱(LC-MS/MS)方法测定MT催化合成SAH或甲基化产物的量;方法三:多酶循环法。MT酶与SAM及其对应的甲基受体物质反应生成的SAH经SAH水解酶等进一步催化最终合成光化学方法可检测的 NAD^+ 。

[0012] 其中,同位素示踪法虽然具有灵敏度高、定位定量准确等优点,但也存在一些缺陷,该方法需要繁琐的底物与产物后续色谱分离,费时费力,而且重复性差,大部分情况下只能做到半定量分析,从事放射性同位素的工作人员必须经过专门训练,同时还需要具备一定的安全防护措施。作为示踪元素的放射性同位素与相应的普通元素之间存在化学性质的微小差异从而引起个别性质上的明显区别,尤其是对于轻元素而言,这种所谓的同位素效应比较严重。此外,该方法还有可能造成放射性污染。

[0013] 高压液相(HPLC)方法测定SAH或甲基化产物的方法也存在一定的局限性。其实无论是HPLC或LC-MS/MS哪种方法测定SAH或甲基化产物含量,对于评估MT活性都是很不准确的。HPLC和LC-MS/MS的样品,需要特殊处理,经过较长时间、较多步骤后SAH或甲基化产物必然有丢失,此外合成反应的产物有可能不稳定,甚至在短时间内降解,若不及时检测将造成检测值偏差。所有这些都会造成所测的值很不准确,更不用说试图达到反映酶动力学反应的目的。

[0014] 至于多酶循环法,常涉及到两种甚至两种以上的酶反应,过程复杂,影响因素甚多,且检测方法需要使用生化仪这类大型的昂贵仪器。因此,研发出一种能准确、快速、直接测定以SAM为甲基供体的甲基转移酶生物学活性的检测方法是非常必要的。

发明内容

[0015] 本发明的目的在于提供一种能准确、快速、实时、直接测定以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶生物学活性的方法以及与该方法配套的试剂盒。本发明基于同时法直接测定其合成的S-腺苷同型半胱氨酸产物含量。只要待检测的MT能以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体,MT将SAM的甲基转移至与其相应的另一底物,SAM转化为SAH,无论体内还是体外方法测定MT酶活性,本发明都可以最直接地第一时间快速地测定SAH的含量,以推算MT活性的高

低。

[0016] 本发明的创新之处在于让MT催化的生化反应与测定SAH的免疫反应同时进行,把这两个过程有机地结合起来,抗S-腺苷同型半胱氨酸特异性抗体快速、简便地测定以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的一类甲基转移酶生物学活性,并通过大量试验探索出一套让这两个反应同时进行并获得最佳检测效果的最佳反应体系和条件。对于准确地测定分子性状极不稳定的SAH尤其具有重大的意义。

[0017] 本发明甲基转移酶活性实时测定方法,包括在一个反应体系内两个同时进行的反应:(1)在保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲体系中,加入含有甲基转移酶的样品、甲基供体和底物或者直接在含有甲基转移酶的液态样品中加入S-腺苷蛋氨酸甲基供体和底物,进行反应以便产生S-腺苷同型半胱氨酸产物,底物为甲基的受体物质;(2)利用免疫学方法检测S-腺苷同型半胱氨酸的含量,来确定反应体系中甲基转移酶的活性。

[0018] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,利用包被抗原法和包被抗体法两种方式的竞争法测量S-腺苷同型半胱氨酸的含量;

[0019] 1)包被抗原法:预先将偶联的SAH抗原包被在固相ELISA板中,同时加入待检抗原和示踪物标记的抗SAH抗体,待检抗原即反应产生的SAH产物,待检抗原与包被抗原共同竞争示踪物标记的抗SAH抗体,反应后洗板,与包被抗原结合的示踪物标记的抗SAH抗体保留,与待检抗原结合的示踪物标记的抗体则被洗掉,最后加入底物显色,最终显色结果与待检抗原量成反比,在测定过程中,用配制的一系列梯度已知量的SAH作为标准品,制作标准曲线;

[0020] 2)包被抗体法:先将羊或兔抗鼠IgG包被的微孔板中加入抗SAH抗体孵育,或者直接包被抗SAH抗体,洗板;加入示踪物标记的SAH抗原,再加入待检抗原,待检抗原即反应产生的SAH产物,待检抗原与示踪物标记的SAH竞争包被在酶联板上的抗SAH特异性抗体,孵育洗板;加入底物显色,在测定过程中,用配制的一系列梯度已知量的SAH作为标准品,制作标准曲线。

[0021] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,采用SAH抗原的类似物替代SAH抗原进行偶联或者示踪物标记。

[0022] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,示踪物包括酶,荧光素,胶体金,化学发光物质,生物素,地高辛,放射性标记物质和各种类型的乳胶微球。

[0023] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,S-腺苷同型半胱氨酸酸抗原是多聚赖氨酸,牛血清白蛋白或者其它载体蛋白偶联。

[0024] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,采用包被抗原法的具体步骤如下:

[0025] (1)不同浓度标准品的配制:取S-腺苷同型半胱氨酸标准品,用缓冲液配制成不同浓度的标准曲线样品;

[0026] (2)在包被有蛋白-SAH偶联物或多聚体-SAH偶联物的微孔板中,加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的抗S-腺苷同型半胱氨酸单克隆抗体,含有S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶的样品及与待测甲基转移酶相应的甲基受体物质的缓冲液体系;如果是液态样品,则直接加入S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶的样品及与待测甲基转移酶相应的甲基受体物质;标准曲线孔中加入配制好的不同浓度梯度的SAH标准品;混匀后反应,洗板;

[0027] (3) 加入辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的底物,显色,加入终止液终止反应,在酶标仪上选择适当波长读取每孔的吸光度读数OD450;

[0028] (4) 在同一酶联板中用配制的一系列已知量的SAH标准品,据其OD450与已知标准品浓度获得曲线方程,再将样本OD450代入方程求得其对应的反应产物SAH的生成量;

[0029] (5) 根据含有甲基转移酶的样品在单位时间内催化生成产物SAH的浓度来计算甲基转移酶的活性。

[0030] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,

[0031] 缓冲液是包括钾离子浓度范围在25-200mM,BSA添加浓度在0.1%-0.9%,pH范围为7.0-8.5的Tris或PB缓冲系统;优选是包括钾离子浓度为100mM,BSA添加浓度0.1%,pH为7.8的PB缓冲系统。

[0032] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,

[0033] 缓冲液配制的用于制作标准曲线的不同浓度的标准品浓度分别为0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10 μ M。

[0034] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,

[0035] 液态样品或者缓冲液中甲基供体加入后的浓度范围为10-30 μ M,底物加入后的浓度范围为10-60 μ M,示踪物标记的抗体稀释度1:3000-1:10000,包被的抗原浓度为0.2-1 μ g/ml;优选液态样品或者缓冲液中甲基供体加入后的浓度20 μ M,底物加入后的浓度20 μ M,示踪物标记的抗体加入的稀释度1:10000,包被的抗原浓度为1 μ g/ml;

[0036] 加入每个微孔的缓冲液体系或者液态样品的体积为50 μ l,稀释后的示踪物标记的抗体的体积为50 μ l。

[0037] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,在测定HMT时,反应时间和温度分别为37 $^{\circ}$ C和20分钟。

[0038] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,采用包被抗原法:预先将BSA偶联SAH抗原包被在固相ELISA板中,包被浓度为1 μ g/ml用BSA封闭后,同时加入待检抗原(含SAH样本)和HRP酶标抗SAH抗体。待检抗原与包被抗原共同竞争酶标抗体,反应后洗板,与包被抗原结合的酶标抗体保留,与待检抗原(游离抗原)结合的酶标抗体则被洗掉。最后加入底物显色,最终显色结果与待检抗原量成反比,即OD450值越高,待测样品中SAH含量越低。在实验过程中,同一ELISA板中用配制的一系列梯度已知量的SAH作为标准品,作为标准曲线。据其OD450读数与已知标准品浓度获得曲线方程,再将样本OD450代入方程求得其对应浓度值。

[0039] 所述的甲基转移酶活性实时测定方法,含有甲基转移酶的样品来源于基因工程表达的产物、生物组织细胞内被纯化出的样品、组织细胞内的甲基转移酶,生物体液或组织细胞培养液,生物体液为血液,血浆,血清,唾液,尿液,脑脊液,腹腔或胸腔渗出液,组织液。

[0040] 本发明另一目的是提供了与上述方法配套的试剂盒,包括:包被有抗S-腺苷同型半胱氨酸抗体或S-腺苷同型半胱氨酸抗原的微孔板;示踪物标记的抗S-腺苷同型半胱氨酸抗体或示踪物标记的S-腺苷同型半胱氨酸抗原;S-腺苷同型半胱氨酸标准品;保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲液、S-腺苷蛋氨酸、待测甲基转移酶相应的甲基受体物质;阳性质控品甲基转移酶;示踪物检测系统。

[0041] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0042] 1、可以直接测定产物SAH的含量从而直接反映了MT的合成SAH的能力;

[0043] 2、本发明中SAH生成和测定在同一个体系内同时完成,不存在滞后,结果准确及时;

[0044] 3、用免疫学方法测定SAH,不仅特异而且非常敏感,不受SAH存在形式上即结合型和游离型的影响;

[0045] 4、与现有技术相比,本发明不需要特殊仪器,仅利用常规实验室中的酶标仪即可进行检测;

[0046] 因此,采用本发明的试剂盒使得MT活性测定更加准确、可靠、直接、简易而快速,可同时获得样品中MT活性和SAH含量。

[0047] 与现有技术相比,本发明的关键点在于:

[0048] 1.同时法,即把MT酶促化学反应和生成的关键产物的定量过程放在一起同时进行,这对于MT活性很低的样品尤其有必要,然后再引入免疫学反应进行的定量产物的检测。而在免疫反应的过程中,MT催化的化学反应仍然在进行,即不断有新的产物SAH生成。本发明的关键点,即把催化反应和免疫反应有机结合为一体从而达到到最佳检测灵敏度。

[0049] 2.最精确地、没有任何延误地反映MT活性的动态变化,由于产物SAH不稳定,如果不能在第一时间对其测定,也不能够有效地、可靠而正确地算出MT酶活性。利用该方法能够以最短的时间,同时测出样品中MT活性和SAH含量。

[0050] 3.只需提供与待测MT相应的作用底物,便可以利用该方法测出样品中MT的活性。

[0051] 4.免疫学方法和生物化学反应的有机结合,使得生物化学反应中的物质能够被有效、快速、特异、敏感地测出。

[0052] 5.使得该同时法能够敏感地反映MT活性变化的反应液配方,既保证酶学催化的生物化学反应能够正常进行,又使得免疫检测步骤得以有效地实施。

[0053] 本发明以HMT为主要实验酶,还从以下几点进行了深入研究和探讨:

[0054] 第一:确定抗SAH抗体与S-腺苷蛋氨酸及另一底物有无交叉,以避免交叉反应对竞争ELISA的干扰,若存在交叉反应,则需要设置好对照去除交叉反应带来的背景。

[0055] 第二:摸索不同pH条件反应缓冲液及钾离子、BSA等对甲基转移酶催化生成SAH的影响。

[0056] 第三:摸索MT浓度及底物的最佳浓度。

[0057] 第四:确定MT合适反应时间,并设置合适时段测SAH反应生成量。

[0058] 第五:做实验反复优化每个组分的最佳浓度,反应时间,缓冲液配方和pH值,标准曲线和标准品范围等。

[0059] 因此,本发明通过一系列条件摸索,找到一套适合于MT催化的生化反应与测定SAH的免疫反应同时进行,并获得最佳检测效果的最佳反应体系和条件。

[0060] 上述技术路线已经在以下实例中得到充分详细的证实。从中不难看出,本发明涉及到的方法的优越性包括但不限于以下:(1)直接测定MT的重要产物SAH而不是次级产物因而是最直接的反映MT的SAH合成能力;(2)SAH生成和测定在同一个体系内一步同时完成,能够很好地捕捉到不同情况下MT活性的变化,更好地控制酶反应时间,因而结果会非常准确而及时;(3)用特异性,灵敏度,亲和力都很高的抗SAH抗体及时定量SAH产物,不仅特异,而且非常敏感,不受SAH存在形式(结合型和游离型)的影响;(4)方便,快捷,因此非常有利于研究各种因素对样品中MT活性的影响,即使影响很微妙,也能够测定出来。

[0061] 本发明的重大意义在于,提供了新的MT测定方法和产品,使得研究人员能够随时方便而准确地测定MT酶活性,有助于与各种MT酶相关的研究和开发工作的深入了解,对于回答蛋氨酸代谢,体内甲基化状况(甲基化过程),为各种情况下的甲基化机制的探讨,表观遗传学的深入研究,代谢性疾病,肿瘤的发生,发展,预后,营养,疾病和健康的研究和监测有重大的意义。

附图说明

[0062] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,以下对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单介绍。

[0063] 图1:直接竞争性ELISA步骤与组成部分示意图。图中显示包被到板上结合的是抗原而非抗体的例子。

[0064] 图2:SAH标准曲线示意图。其中横轴为以10为底,SAH标准品浓度的对数值,纵轴为 $OD_{450}/OD_{450_{\text{零竞争}}}$ 与 $1-OD_{450}/OD_{450_{\text{零竞争}}}$ 的比值的自然对数值,或称为LOGIT。

具体实施方式

[0065] 下面结合实验结果及数据进一步对本发明作详细说明。未提到的原料为常规商品化试剂,可以从市场上购得。

[0066] 实施例1抗SAH抗体与同型半胱氨酸甲基转移酶底物SAM和Hcy交叉反应

[0067] 实验材料

[0068] HRP酶标抗SAH抗体:Arthus Biosystems,MAH00301;牛血清白蛋白BSA-SAH:Arthus Biosystems,ACT00301;S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)标准品:Arthus Biosystems,AST00301;

[0069] S-腺苷蛋氨酸:Sigma,A2408,;同型半胱氨酸甲基转移酶(HMT):北京爱必信生物技术有限公司Abt-P-005;BSA,Tris-Cl,NaCl,NaH₂PO₄,Na₂HPO₄,Na₂HPO₄·12H₂O:北京华美加成生物技术有限公司;KCl:天津大茂化学试剂厂;同型半胱氨酸(Hcy),ProClin 300:Sigma;TMB显色液:湖州英创生物技术有限公司;硫酸:湖南康都制药有限公司;96孔酶联板:美国Corning高吸附酶联板条。

[0070] 试剂配制:

[0071] 根据初始的实验,实验体系所使用的BSA-SAH包被浓度为0.2ug/ml,SAH的检测范围为0-1uM,而酶反应所生成的SAH超出了该检测范围,故对SAH抗原的包被浓度进行重新调整后,将SAH的检测范围扩大为0-10uM,BSA-SAH的包被浓度为1ug/ml,方便后期的各种条件的考察。

[0072] 酶反应缓冲液:100mM PB,100mM KCl,BSA 0.1%调pH7.80,pH8.0,pH8.5;SAH标准品(SAHNa):10uM、5uM、2.5uM、1.25uM、0.625uM、0.3125uM、4uM、0uM,缓冲液为pH 7.80酶反应缓冲液;SAH质控品(SAHNa):4uM,缓冲液为pH7.80酶反应缓冲液。

[0073] 取包被BSA-SAH抗原ELISA板条,SAH标准曲线用0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10uM标准品,SAM和Hcy交叉物浓度0、10、50、100、500uM。HRP-抗SAH酶标抗体1:10000用HRP稀释液稀释。标准品和交叉类似物Hcy和SAM每孔50ul,HRP-抗SAM抗体稀释后每孔加50ul。37℃反应1h,洗板后100ul TMB37℃显色15min,终止液加50ul后读数。结果如下:

[0074] 表2抗SAH单克隆抗体与SAM和Hcy的反应率(A/A0)

[0075]

SAH uM	SAH标曲	SAM	Hcy	uM	交叉率
0	1	1	1	0	
0.625	1.040477	1.032789	1.070128	10	50%
1.25	0.939679	0.9205	1.024436	50	10%
2.5	0.821427	0.920895	0.988759	100	5%
5	0.678864	0.433362	0.69237	500	1%
10	0.524789				
交叉率		1%~5%	<1%		

[0076] A/A0;反应率(A0为0nM时OD450读数,A为游离小分子竞争孔的OD450读数)

[0077] 交叉率=(C游离抗原50%抑制/C交叉物50%抑制)*100%

[0078] 根据结果来看,Hcy与抗SAH单克隆抗体的交叉反应远小于1%,而SAM与抗SAH单克隆抗体虽然存在交叉,但交叉基本在1%~5%范围内,因此,实验实施时可添加仅有SAM的实验组以去除交叉反应所造成的背景。

[0079] 根据图2所示标准曲线示例,横轴为以10为底,SAH标准品浓度的对数值,纵轴为OD450/OD450_{零竞争}与1-OD450/OD450_{零竞争}的自然对数值。拟合的曲线后将样本OD450代入方程即可求得对应SAH浓度值。

[0080] 实施例2:体外测定HMT活性最适宜缓冲体系

[0081] 取包被BSA-SAHA抗原的ELISA板条,分别以pH7.79、pH8.04、pH8.23、pH8.39的20mM Tris缓冲液和pH7.0、pH7.4、pH7.8、pH8.0的100mM PB缓冲液配制含20uM SAM、20uM Hcy和1ug/ml HMT的HMT体系反应液,反应液每孔50ul,HRP标记的抗体每孔50ul,37℃反应20min,洗板后每孔加入100ul TMB,37℃显色15min后加入终止液50ul后读数。其中SAH标准曲线用0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10uM标准品,且分别用pH7.8PB缓冲液和pH 8.25Tris缓冲液配制。将所检测到的标曲进行拟合,并分别计算各实验组SAH的生成量。结果如下表所示:

[0082] 表3不同pH、缓冲液条件下HMT催化SAH生成对比

[0083]

Tris (20 mM) pH	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM	PB (100 mM) pH	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM
7.79	0.0000	2.0354	2.0354	7.0	0.0000	1.9066	1.9066
8.04	0.0000	2.7362	2.7362	7.4	0.0000	3.3527	3.3527
8.23	0.0000	2.9242	2.9242	7.8	0.3571	3.9432	3.5860
8.39	0.0000	3.0330	3.0330	8.0	0.4531	3.9383	3.4852

[0084] SAH的生成量由检测值去除背景值表示。由以上的结果可知:(1)在不同pH条件下,底物、酶量不变时,pH8.38的Tris缓冲液及pH7.8的PB缓冲液中的SAH生成量分别为Tris和PB缓冲液中最高;(2)随着pH的升高,SAH的生成量有一定程度的提高,但随着pH上升到一定范围后,SAH生成量的提高不是很显著;(3)而对比Tris和PB缓冲液,PB缓冲液中的SAH生成量稍高。

[0085] 为考察离子添加对HMT体系的影响,初步以pH7.8的PB缓冲液K⁺、BSA考察。结果如

下表所示：

[0086] 表4不同浓度 K^+ 、BSA条件下HMT催化SAH生成对比 (PB缓冲液)

	K^+ mM	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM	BSA %	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM
[0087]	0	0.0000	4.4845	4.4845	0	0.4397	3.0322	2.5925
	25	0.3911	4.7531	4.3620	0.1	0.4228	4.5853	4.5853
	50	0.3576	4.7807	4.4231	0.3	0.3305	3.5472	3.2167
	100	0.3318	5.0195	4.6877	0.5	0.4061	3.6361	3.2300
[0088]	150	0.3593	4.4959	4.1366	0.7	0.3758	3.4831	3.1074
	200	0.3559	4.1210	3.7651	0.9	0.3419	2.7652	2.4233

[0089] 由上述结果可知：(1) K^+ 的添加对促进SAH的生成并无显著效果，但相对而言，100mM的 K^+ 对SAH的生成少量促进作用，而稍高浓度的 K^+ 如200mM将造成SAH的生成量减少；(2) BSA的添加在一定浓度范围内可使SAH的生成量提高，但随着BSA浓度的增加，这种促进作用将逐步减弱。

[0090] 表5不同浓度 K^+ 、 Mg^{2+} 条件下HMT催化SAH生成对比 (Tris缓冲液)

[0091]

K^+ mM	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM	Mg^{2+} mM	背景值 SAH uM	检测值 SAH uM	生成值 SAH uM
0	0.0000	4.0197	4.0197	0	0.0000	4.0197	4.0197
25	0.4540	3.3344	2.8804	25	0.3687	4.0089	3.6402
50	0.3726	3.3947	3.0221	50	0.4099	3.6336	3.2237
100	0.3687	4.0089	3.6402	100	0.4362	3.7259	3.2897
150	0.0000	2.3132	2.3132	150	0.4523	3.1603	2.7080
200	0.0000	2.4872	2.4872	200	0.4233	2.8456	2.4223
PB Buffer	0.7957	5.2481	4.4524				

[0092] 由于 Mg^{2+} 在PB溶液中将发生较强的水解，故在PB缓冲液中不做 Mg^{2+} 的考察，而在Tris中添加 K^+ 、 Mg^{2+} 的结果也表明：(1) Mg^{2+} 浓度从25mM增加到200mM，SAH的生成量将持续下降，说明 Mg^{2+} 并不能促进甲基转移酶催化合成SAH。因此在后期的实验中所使用的酶反应缓冲液均不添加 Mg^{2+} ；(2) K^+ 添加量对SAH生成的影响与PB缓冲液中的趋势相似， K^+ 的浓度为100mM时，SAH的生成较高，但从整体上来看SAH的生成量低于不添加 K^+ 的实验组；(3) Tris中无论是添加 K^+ 还是 Mg^{2+} ，SAH的生成量比PB缓冲液中SAH的生成量均低一些。

[0093] 综合上述实验结果，后期实验将选择0.1% BSA, 100mM K^+ , pH7.80的PB缓冲液作为酶反应缓冲液。

[0094] 实施例3：体外测定HMT的酶浓度及底物浓度

[0095] 取包被BSA-SAH抗原ELISA板条，以酶反应缓冲液pH7.8配制SAH标准品0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10uM及4uM质控。并配制不同浓度的SAM、Hcy和HMT酶配方。标准品和酶反应物每孔50uL，HRP标记的抗体每孔50uL。37℃反应时长取20min、30min、40min，洗板后100uL TMB 37℃显色15min，终止液50uL后读数。

[0096] 表6不同底物浓度、HMT浓度条件下HMT催化SAH生成对比

[0097]

	HMT 0.5 ug/ml			HMT 1 ug/ml			HMT 2 ug/ml		
	SAM uM			SAM uM			SAM uM		
Hcy uM	10	20	40	10	20	40	10	20	40
0	0.0000	0.4228	0.5780	0.0000	0.4228	0.5780	0.0000	0.4228	0.5780
10	2.7810	4.5202	6.7398	2.8403	4.8657	6.0453	2.4963	4.5196	7.8047
20	2.7196	5.0169	7.3387	2.9731	4.5853	7.5915	2.3913	4.9236	9.2510
40	2.6911	5.0519	6.9048	2.9017	4.1598	8.5369	2.7231	5.1001	8.8352

[0098] 根据上表的结果, SAM浓度的增加将造成背景值的增加, 这是由SAM与抗SAH单克隆抗体的交叉反应所引起。同时, SAM浓度的增加将显著促进SAH的生成量的增加, 但在酶浓度及Hcy的浓度一定的条件下, SAM的持续增加, 其转化为SAH的转化率是有所降低的, 因此从背景值及成本两方面考虑, SAM的浓度不宜过高。相对SAM, Hcy浓度的增加对SAH生成的促进作用比较弱。而HMT酶浓度的提高从整体上来说, 可使SAH的量略有提高, 但提高量并不显著。

[0099] 为进一步考察Hcy浓度及酶浓度对SAH生成的影响, 将SAM的浓度定为20uM, 配制不同浓度的Hcy和HMT酶的反应液。

[0100] 表7不同Hcy浓度、HMT浓度条件下SAH的生成对比

	HMT ug/ml			
Hcy uM	0.3	0.5	0.7	1
20	2.5663	3.5370	3.1549	4.2147
40	2.8292	3.7718	3.5365	4.2146
60	4.0043	3.9159	3.6294	3.7471
80	3.4362	2.9152	3.6850	3.6062

[0102] HMT酶的浓度为0.3ug/ml时, Hcy浓度提高, SAH的生成量有所增加, 尤其是当Hcy的浓度从40uM提高到60uM时, SAH的生成量有显著增加, 而当Hcy的浓度继续提高到80uM时, SAH的生成量开始下降, 且HMT的浓度为0.5ug/ml和1ug/ml时的趋势也是如此。因此Hcy的最佳使用浓度不应超过60uM。而对于HMT的使用浓度, 在SAM和Hcy均为20uM的条件下, 从0.3ug/ml到0.5ug/ml, SAH的生成有显著增加, 进一步将HMT酶提高到1ug/ml时, SAH的生成仍有一定程度提高, 但对比上一步的实验, SAM和Hcy均为20uM, HMT在2ug/ml时, SAH的生成量与1ug/ml实验组相差不多。

[0103] 实施例4: 体外测定HMT活性最适宜反应时间段确定

[0104] 取包被BSA-SAHA抗原ELISA板条, 以酶反应缓冲液pH7.8配制SAH标准品0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10uM及4uM质控。配制SAM和Hcy 20uM、HMT酶1ug/ml, SAM和Hcy 20uM、HMT酶0.7ug/ml、SAM和Hcy 20uM、HMT酶0.5ug/ml, (均为终浓度) 作为生成SAH底物与酶量。标准品和酶反应物每孔50uL, HRP标记的抗体每孔50uL。37℃反应时长取20min、40min、60min, 洗板后100uL TMB 37℃显色15min, 终止液50uL后读数。

[0105] 表8不同反应时间对HMT催化合成SAH的量的影响

反应时间 min	HMT ug/ml		
	0.5	0.7	1
20	3.5442	4.0158	4.1985
40	3.4926	4.1176	4.0432
60	3.8706	4.4955	4.0985

[0107] 从上述结果显示,结果显示,HMT酶生成SAH量在20-60min时,SAH量无明显变化,基本处于平台期,说明20min后可能底物浓度不够或者所生成的SAH已经对HMT酶产生了产物抑制,导致SAH生成量无增加。

[0108] 实施例5:正常肝细胞系L02的MT活性

[0109] 实验材料:

[0110] 无菌PBS,0.25%胰酶(阿拉丁),10%FBS(元亨圣马)的1640培养基(Gibco),75cm²方瓶(Corning),磷酸盐缓冲液(PBS):NaCl 8g,Na₂HPO₄·12H₂O 2.885g,KCl 0.2g,KH₂PO₄ 0.2g,超纯水1000ml;胰酶(0.25%胰蛋白酶):胰蛋白酶0.1g,4%EDTA溶液200μl,1×PBS溶液39.8ml;胰蛋白酶充分溶解后用0.2μm无菌过滤头(Pall)过滤。台盼蓝溶液(4%曲利苯蓝溶液,阿拉丁):曲利苯蓝1.6g,超纯水40ml,用滤纸过滤。

[0111] 实验步骤:

[0112] 1.观察方瓶内细胞处于80%左右汇合度时,将10%胎牛血清的1640培养基去除后用PBS洗一遍;

[0113] 2.加入适量体积的胰酶,保证胰酶覆盖整个方瓶底部;

[0114] 3.将方瓶置于37℃、5%CO₂培养箱中2-3min,当细胞开始成片脱落时,加入5ml含10%FBS的1640培养基终止。

[0115] 4.离心后用1ml左右PBS重悬,台盼蓝计数;

[0116] 5.取1ml各组细胞悬液在冰浴中超声破碎,在15000g下离心取上清。

[0117] 6.取包被BSA-SAH抗原ELISA板条,BSA-SAH的包被浓度为1ug/ml,以酶反应缓冲液pH7.8配制SAH标准品0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10uM及4uM质控。

[0118] 7.以细胞破碎液为酶反应液分别配制SAM 5uM和20uM,以及SAM 5uM&Hcy20uM,SAM 20uM&Hcy 20uM的反应液,标准品和酶反应物每孔50u1,HRP-抗SAH酶标抗体1:10000用HRP稀释液稀释,每孔50u1,37℃反应20min。洗板后100u1 TMB 37℃显色15min,终止液50u1后读数。结合台盼蓝计数的结果,将L02的细胞量调整为10⁸cells,并将SAH相应地

[0119] 调整为该密度下的反应生成量。

[0120] 表9.正常肝细胞系L02的MT催化合成的SAH

[0121]

	SAH (uM)
SAM 5uM	1.618283
SAM 20uM	2.718398
SAM 5uM+Hcy 20uM	2.694052
SAM 20uM+Hcy 20uM	3.724836

[0122] 由上表可知,添加SAM,有SAH生成,说明细胞裂解液中的MT催化了SAM的甲基转移,从而生成SAH,SAM的浓度增加,SAH的生成也有一定程度的增加。而在添加SAM的基础上再添

加Hcy,SAH的生成量也有增加,这说明该细胞裂解液中存在一定量的HMT,而且还存在其他种类的MT。足以证明用该方法测定以SAM为甲基供体的一类甲基转移酶活性的可实施性。

[0123] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

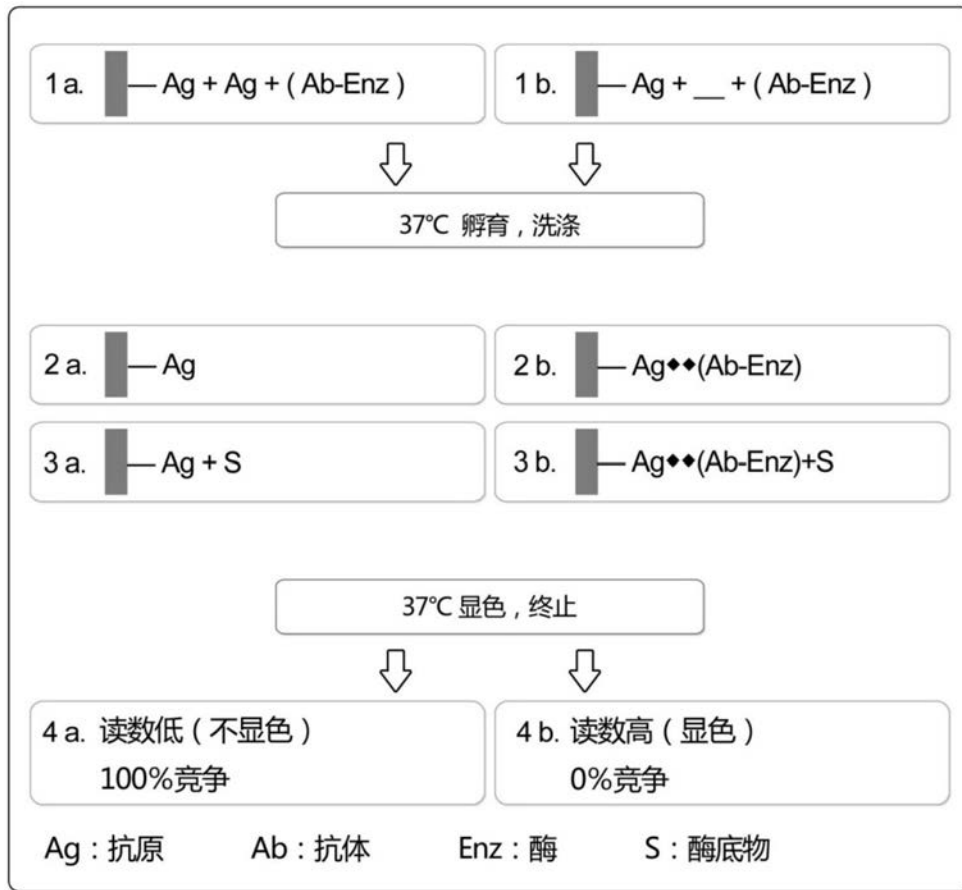


图1

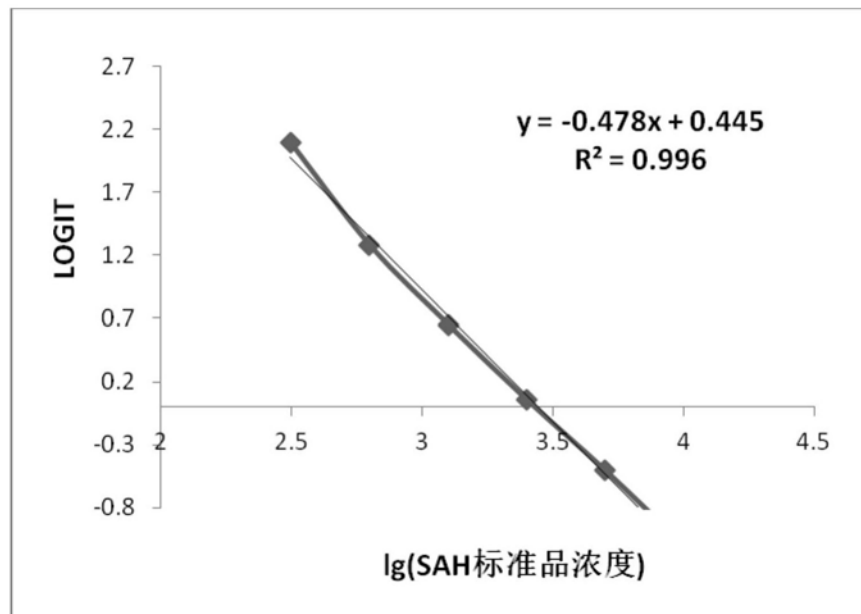


图2

专利名称(译)	一种甲基转移酶活性实时测定方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN106053795B	公开(公告)日	2019-02-12
申请号	CN201610549785.7	申请日	2016-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	湖南天合生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	湖南天合生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	湖南天合生物技术有限公司		
[标]发明人	郝秀娟 周敏		
发明人	郝秀娟 周敏		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558		
代理人(译)	袁靖		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN106053795A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甲基转移酶活性实时测定方法及试剂盒。包括在一个反应体系内两个同时进行的反应：(1)在保证以S-腺苷蛋氨酸为甲基供体的甲基转移酶有生物学活性的缓冲体系中，加入含有甲基转移酶(MT)的样品、甲基供体和相应的底物或者直接在含有甲基转移酶的液态样品中加入S-腺苷蛋氨酸甲基供体和相应的底物进行反应以便产生S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)产物，底物为甲基的受体物质；(2)利用免疫学方法检测SAH的含量，来确定反应体系中甲基转移酶的活性。本发明把MT催化的生化反应与测定产物SAH的免疫反应同时进行，把这两个过程有机地结合起来，对于准确地测定分子性状极其不稳定的SAH尤其具有重大的意义。

名称	作用底物	研究对象	研究内容
疏(硫)嘌呤甲基转移酶	疏嘌呤、6-硫嘌呤等嘌呤类药物	人	功能、基因多态性等
生育酚甲基转移酶	生育酚	植物	启动子、基因转化
儿茶酚-O-甲基转移酶	儿茶酚胺类化合物	人	基因多态性与疾病的关系
磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶	磷脂酰乙醇胺	人	表达与疾病
组蛋白甲基转移酶	组蛋白精氨酸或赖氨酸残基	人	肿瘤发生
蛋白精氨酸甲基转移酶 I/II	蛋白精氨酸残基、髓鞘碱性蛋白	人	种类、疾病的发生
甘氨酸-N-甲基转移酶	甘氨酸	鼠	神经干细胞的分化
黄嘌呤-N-甲基转移酶	7-甲基黄嘌呤	茶叶	基因克隆与序列分析
肌醇甲基转移酶	肌醇	烟草	与耐盐性的关系
苯基乙醇-N-甲基转移酶	肾上腺素胺	人	功能与活性位点
无机砷甲基转移酶	无机砷	鼠	表达与活性
白杨-O-甲基转移酶	C7-羟基类黄酮	植物	蛋白区域选择性
佛手酚-O-甲基转移酶	佛手酚	大阿米芹	底物特异性
查耳酮-O-甲基转移酶	2,4,4'-三羟基查耳酮	紫花苜蓿	晶体结构、作用底物
异黄酮-O-甲基转移酶	7-羟基大豆苷元	苜蓿属植物	功能
水稻-O-甲基转移酶	3-羟基类黄酮	水稻	基因克隆与功能鉴定
大豆-O-甲基转移酶	木犀草素、槲皮素	大豆	基因克隆与功能鉴定
咖啡酸-O-甲基转移酶	5-羟基松柏醇	植物	木质素合成
咖啡酰辅酶A甲基转移酶	咖啡酰辅酶A	苎麻	基因表达
羟基吡啶-O-甲基转移酶	N-乙酰羟基色胺	鸡	活性与功能
黄烷醇-O-甲基转移酶	柚皮素	植物	表达与功能鉴定
安息香酸胺基甲基转移酶	安息香酸	植物	晶体结构与机制
茉莉酮酸胺基甲基转移酶	茉莉酮酸	植物	晶体结构与机制
水杨酸胺基甲基转移酶	水杨酸	植物	晶体结构与机制
尿嘧啶III甲基转移酶	尿嘧啶III	玉米	表达与功能鉴定
法尼酸-O-甲基转移酶	法尼酸	节肢动物、莎草	基因克隆与鉴定
保幼激素酸-O-甲基转移酶	保幼激素酸	节肢动物	基因克隆与功能鉴定