



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103529219 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310472617. 9

(22) 申请日 2013. 10. 10

(71) 申请人 南京大学医学院附属鼓楼医院
地址 210008 江苏省南京市中山路 321 号

(72) 发明人 马正良 顾小萍 孙玉娥

(74) 专利代理机构 南京中新达专利代理有限公司 32226

代理人 孙鸥 朱杰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

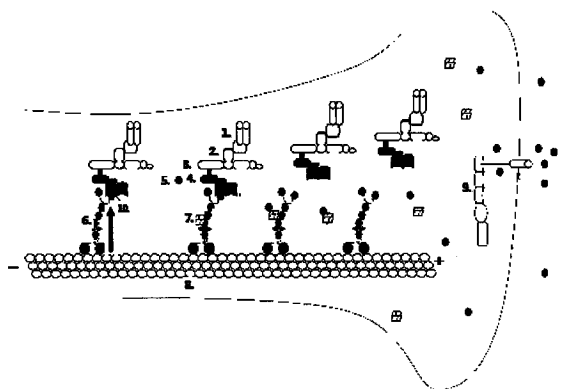
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

阻断KIF17-m Lin10-NR2B转运通路的试剂盒及制备方法

(57) 摘要

本发明涉及阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒及制备方法。本发明包括 KIF17、接头蛋白 mLin10-PDZ1、接头蛋白 mLin2、mLin7、NR2B、KIF17；其中，KIF17 是始动单元，接头蛋白 mLin10-PDZ1 是第一连接单元，接头蛋白 mLin2 是第二连接单元，接头蛋白 mLin7 是第三连接单元，NR2B 是被捆绑单元。本发明解决了单一或联合阻断其中的一条或几条通路并不能有效阻断 NR2B 在树突膜的表达上调的缺陷。本发明结构清楚，作用机制明确，能够较为完善的调制 NR2B 介导的痛觉过敏反应。与多数一般有机小分子药物相比，肽类药物试剂盒具有活性高、用药剂量小、毒副作用低、代谢终产物为氨基酸等突出特点；与蛋白类相比，小肽几乎没有免疫原性；可化学合成，产品纯度高，质量可控。



1. 阻断 KIF17-mLin10-NR2B 转运通路的试剂盒,其特征在于包括 KIF17、接头蛋白 mLin10-PDZ1、接头蛋白 mLin2、mLin7、NR2B、KIF17;其中, KIF17 是始动单元,接头蛋白 mLin10-PDZ1 是第一连接单元,接头蛋白 mLin2 是第二连接单元,接头蛋白 mLin7 是第三连接单元, NR2B 是被捆绑单元。

2. 根据权利要求 1 所述的阻断 KIF17-mLin10-NR2B 转运通路的试剂盒,其特征在于 KIF17 触发后与第一连接单元接头蛋白 mLin10-PDZ1 结合组成结合体,结合体进一步与第二连接单元接头蛋白 mLin2 及第三连接单元接头蛋白 mLin7 结合成更大的结合体,其中第三连接单元接头蛋白 mLin7 发生构型变化,与被捆绑单元 NR2B 紧密结合。

3. 一种如权利要求 1 所述的阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒制备方法,其步骤在于:

(1) 采用 Trizol 抽提疼痛模型大鼠尾静脉血清中的总 RNA,再利用 RT-PCR 技术分别扩增包含 KIF17、Mint1、NR2B cDNA 的主要免疫表位多肽和截短多肽的基因片断;

(2) 将扩增的基因片断插入提取的正常大鼠细胞内;

(3) 利用数学模型筛选法和理性数据库筛选法,结合蛋白质和配体相互作用的 MJ 矩阵和隐马可夫模型的规则,为蛋白质 KIF17 筛选小肽抑制剂 RC-13;

(4) 采用 Ni-NTA 树脂层析纯化,最终获得高纯度的重组小肽,制备成阻断 KIF17-mLin10-NR2B 转运通路的试剂盒。

阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学领域,特别涉及阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒及制备方法。

背景技术

[0002] 在本发明之前,在医学界对疼痛的研究表明, NR2B 信号分子及其上下游各种蛋白激酶通路在疼痛的产生以及维持过程中发挥着重要作用,如 EphBR-Src-NR2B 通路、Cdk5-ERK1/2-NR2B 通路、NR2B-CaMKII 通路、NR2B-nNOS 通路、PKA-NR2B 通路、PKC-NR2B 通路等。研究表明这些通路间相互调控,共同形成了一个网络。单一或联合阻断其中的一条或几条通路并不能有效阻断 NR2B 在树突膜的表达上调,加上其特异性差,使得不良反应较大,治疗疼痛的效果也不十分理想。

发明内容

[0003] 本发明的目的就在于克服上述缺陷,研制阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒及制备方法。

[0004] 本发明的技术方案是:

[0005] 阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒,其主要技术特征在于包括 KIF17、接头蛋白 mLin10-PDZ1、接头蛋白 mLin2、mLin7、NR2B、KIF17;其中, KIF17 是始动单元,接头蛋白 mLin10-PDZ1 是第一连接单元,接头蛋白 mLin2 是第二连接单元,接头蛋白 mLin7 是第三连接单元, NR2B 是被捆绑单元;。

[0006] 所述 KIF17 触发后与第一连接单元接头蛋白 mLin10-PDZ1 结合组成结合体,结合体进一步与第二连接单元接头蛋白 mLin2 及第三连接单元接头蛋白 mLin7 结合成更大的结合体,其中第三连接单元接头蛋白 mLin7 发生构型变化,与被捆绑单元 NR2B 紧密结合。

[0007] 本发明的另一技术方案是:

[0008] 阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒制备方法,其步骤在于:

[0009] (1) 采用 Trizol 抽提疼痛模型大鼠尾静脉血清中的总 RNA,再利用 RT-PCR 技术分别扩增包含 KIF17、Mint1、NR2B cDNA 的主要免疫表位多肽和截短多肽的基因片断;

[0010] (2) 将扩增的基因片断插入提取的正常大鼠细胞内;

[0011] (3) 利用数学模型筛选法和理性数据库筛选法,结合蛋白质和配体相互作用的 MJ 矩阵和隐马可夫模型的规则,为蛋白质 KIF17 筛选小肽抑制剂 RC-13。

[0012] (4) 采用 Ni-NTA 树脂层析纯化,最终获得高纯度的重组小肽,制备成阻断 KIF17-mLin10-NR2B 转运通路的试剂盒。

[0013] 本发明的有益效果是,结构清楚,作用机制明确,相对于之前单一通路的阻滞无法达到疼痛信号的网络式阻滞,能够较为完善的调制 NR2B 介导的痛觉过敏反应。与多数一般有机小分子药物相比,肽类药物试剂盒具有活性高、用药剂量小、毒副作用低、代谢终产物为氨基酸等突出特点;与蛋白类相比,小肽几乎没有免疫原性;可化学合成,产品纯度高,

质量可控。

[0014] 本发明的其他具体优点和效果将在下面继续说明。

附图说明

[0015] 图 1——本发明的机制原理图。

[0016] 图中各标号与名称之间对应关系如下：

[0017] NR2B(1)、mLin7(2)、mLin2(3)、mLin10(4)、钙 / 钙调蛋白 (5)、KI F17(6)、CaMKII(7)、微管 (8)、PSD95(9)、PDZ1(10)。

具体实施方式

[0018] 本发明的技术思路是：

[0019] 一种驱动蛋白 17 竞争性小肽抑制剂 RC-13, 通过竞争性与 Mint1-PDZ1 结构域结合, “抢占” KIF17 尾部 C- 末端的作用位点, 使驱动蛋白 17 尾部 C- 末端和衔接蛋白 Mint1 的特异性结合受到限制, 影响神经元内含 NR2B 亚基的 NMDA 受体翻译后的正常转运过程, 使得定位于突触后膜的 NR2B 量减少, 疼痛信号的转导减弱。

[0020] 下面是具体说明：

[0021] 如图 1 所示, 试剂盒包括 KIF17(6)、接头蛋白 mLin10(4)-PDZ1(10)、接头蛋白 mLin2(3)、mLin7(2)、NR2B(1) KIF17(6)。

[0022] 其中, KI F17(6) 是始动单元 ; 接头蛋白 mLin10(4)-PDZ1(10) 是第一连接单元 ; 接头蛋白 mLin2(3) 是第二连接单元 ; mLin7(2) 是第三连接单元 ; NR2B(1) KIF17(6) 是捆绑单元。

[0023] 试剂盒制备方法：

[0024] 采用 Trizol 提取疼痛模型大鼠尾静脉 200 μ l 血清总 RNA, 用随机引物逆转录合成 cDNA, 采用巢式 PCR 扩增 KIF17、Mint1、NR2B 基因片断。PCR 反应条件为 : 94 $^{\circ}$ C -30 秒, 55 $^{\circ}$ C -30 秒, 72 $^{\circ}$ C -60 秒, 35 个循环。PCR 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后检测到大小约 639bp 的条带。琼脂糖凝胶回收纯化是使用北京天根生化科技有限公司的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 按照说明书操作即可。

[0025] 通过 T-A 克隆原理, 将纯化的 PCR 产物插入提取正常大鼠的细胞内, 利用数学模型筛选法和理性数据库筛选法, 结合蛋白质和配体相互作用的 MJ 矩阵和隐马可夫模型的规则, 为蛋白质 KIF17 筛选小肽抑制剂 RC-13。因此, 获得的阻断 KIF17-m Lin10-NR2B 转运通路的试剂盒。

[0026] 本发明的应用过程说明：

[0027] KIF17(6) 的尾部和接头蛋白 mLin10(4)-PDZ1(10) 结构域结合, mLin10(4) 再依次结合接头蛋白 mLin2(3)、mLin7(2), mLin7(2) 再与 NR2B(1) 结合。装载了 NR2B(1) 的 KIF17(6) 沿着微管 (8) 由负极向正极移动, 到达树突末端的时候, KIF17(6) 的丝氨酸 1029 被钙 / 钙调蛋白 (5) 依赖的 CaMKII(7) 磷酸化, 释放出 NR2B(1), NR2B(1) 在 PSD95(9) 的作用下被锚定到细胞膜上。箭头所示 : 此小肽主要作用是干扰 KIF17(6) 与 mLin10(4)-PDZ1(10) 结构域之间的作用。

[0028] 竞争性小肽抑制剂 RC-13, 通过竞争性与 Mint1-PDZ1 结构域结合, “抢占” KIF17 尾

部 C-末端的作用位点,使驱动蛋白 17 尾部 C-末端和衔接蛋白 Mint1 的特异性结合受到限制,影响神经元内含 NR2B 亚基的 NMDA 受体翻译后的正常转运过程,使得定位于突触后膜的 NR2B 量减少。

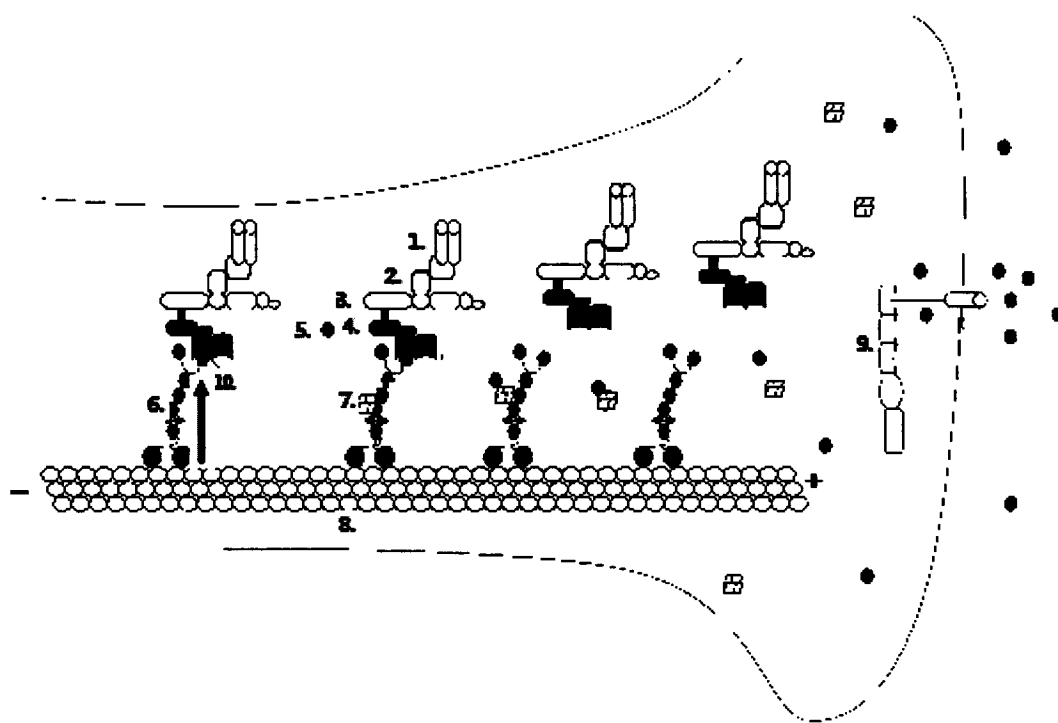


图 1

专利名称(译)	阻断KIF17-m Lin10-NR2B转运通路的试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN103529219A	公开(公告)日	2014-01-22
申请号	CN201310472617.9	申请日	2013-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	南京大学医学院附属鼓楼医院		
申请(专利权)人(译)	南京大学医学院附属鼓楼医院		
[标]发明人	马正良 顾小萍 孙玉娥		
发明人	马正良 顾小萍 孙玉娥		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/5041		
代理人(译)	孙鸥 朱杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及阻断KIF17-m Lin10-NR2B转运通路的试剂盒及制备方法。本发明包括KIF17、接头蛋白mLin10-PDZ1、接头蛋白mLin2、mLin7、NR2B、KIF17；其中，KIF17是始动单元，接头蛋白mLin10-PDZ1是第一连接单元，接头蛋白mLin2是第二连接单元，接头蛋白mLin7是第三连接单元，NR2B是被捆绑单元。本发明解决了单一或联合阻断其中的一条或几条通路并不能有效阻断NR2B在树突膜的表达上调的缺陷。本发明结构清楚，作用机制明确，能够较为完善的调制NR2B介导的痛觉过敏反应。与多数一般有机小分子药物相比，肽类药物试剂盒具有活性高、用药剂量小、毒副作用低、代谢终产物为氨基酸等突出特点；与蛋白类相比，小肽几乎没有免疫原性；可化学合成，产品纯度高，质量可控。

