



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101726603 A

(43) 申请公布日 2010.06.09

(21) 申请号 200910254442.8

(22) 申请日 2009.12.22

(71) 申请人 陕西北美基因股份有限公司

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号

(72) 发明人 崔亚丽 胡佳 陈超

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限

公司 61211

代理人 徐平

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

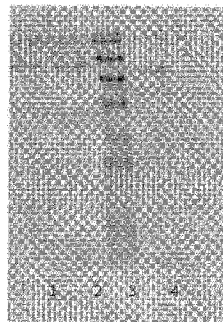
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,属于免疫沉淀领域,该免疫沉淀反应的方法是在生物样品中先加入抗体免疫沉淀反应后,再加进固定了蛋白 A/G 的载体分离,或在生物样品中加入固定了抗体的载体进行免疫沉淀反应后分离,其主要包括抗体的固定、免疫反应、洗脱步骤。它解决了现有免疫沉淀方法中有非特异性结合,可采用的抗体选择种类少,抗体活性损失大的问题,主要用来分离生物样本中的已知特定蛋白质的个别免疫沉淀法(IP);用来研究整个蛋白质复合体;测定两种目标蛋白质是否在体内结合,确定一种特定蛋白质的新作用搭档的免疫共沉淀法(Co-IP);用来研究与 DNA 结合的蛋白质的染色质免疫沉淀法(ChIP);用来研究与 RNA 结合的蛋白质的 RNA 免疫沉淀法(RIP)等。



1. 一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,它的实现步骤包括:

(1) 抗体的固定:选取金磁微粒作为反应的固相载体,将目标生物物质的特异性抗体直接偶联在金磁微粒的表面;所述将目标生物物质的特异性抗体偶联在金磁微粒表面的方法包括:

(1.1) 金磁微粒预处理:

取金磁微粒,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;加入偶联缓冲液,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清,即得到预处理好的金磁微粒;

(1.2) 偶联抗体:

取目标生物物质的特异性抗体,加入偶联缓冲液稀释,再加入至预处理好的金磁微粒中,置于摇床中,0~37℃条件下,充分反应10min~30min,磁性分离,弃上清;加入清洗缓冲液,轻摇重悬,磁性分离,弃上清;加入保存缓冲液,2~8℃保存备用。

(2) 稀释目的生物样品:

取目的生物样品,加入反应缓冲液稀释,保存备用。

(3) 免疫沉淀反应:

(3.1) 前处理:

取上述步骤(1)中固定了目标生物物质的特异性抗体的金磁微粒,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;

(3.2) 反应:

加入上述步骤(2)中稀释好的目的生物样品,混合均匀,0~37℃条件下,充分反应5min~60min,磁性分离,弃上清,即为含有免疫沉淀复合物的磁性微粒复合物;

(4) 免疫沉淀复合物的洗脱:

取上述步骤(3.2)中的磁性微粒复合物,加入洗脱缓冲液,混合均匀,037℃条件下,充分反应5min~60min,磁性分离,移取分离后上清,即为所需的免疫沉淀复合物。

2. 根据权利要求1所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,它的实现步骤还包括目标生物物质的特异性抗体的亲和配体的固定:

在将目标生物物质的特异性抗体加入预处理好的金磁微粒中偶联之前,先加入目标生物物质的特异性抗体的亲和配体,0~37℃条件下,充分反应10min~30min,磁性分离,弃上清;再加入清洗缓冲液清洗,磁性分离,弃上清。

3. 根据权利要求1所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,所述方法包括磁性微粒的再生和保存步骤:

用再生缓冲液清洗上述步骤(3.2)免疫反应后的金磁微粒,将吸附到金磁微粒上的目标生物物质的特异性抗体从金磁微粒上洗脱下来,得到再生后的金磁微粒,再加入保存缓冲液,2℃~8℃保存备用。

4. 根据权利要求1所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,所述方法还包括金磁微粒的封闭步骤:

在步骤(1.2)金磁微粒与目标生物物质的特异性抗体固定之后,步骤(3)免疫沉淀反应之前,先加入封闭剂,在0~37℃条件下,摇床中充分反应2h,磁性分离,弃上清;再加入清洗缓冲液清洗,磁性分离,弃上清,重复清洗至少三次。

5. 根据权利要求2所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:所述

的目标生物物质的特异性抗体的亲和配体为蛋白 A 或蛋白 G。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:

所述目的生物样品是血清、血浆、脑脊液、细胞裂解液;

所述目标生物物质包括蛋白质, DNA, RNA, 细菌, 细胞;

所述目标生物物质的抗体包括相应生物物质的抗体或者多肽;

所述免疫沉淀复合物包括蛋白与蛋白的复合物, DNA 与蛋白的复合物, RNA 与蛋白的复合物, 细菌与蛋白的复合物。

7. 根据权利要求 3 或 4 所述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:

所述偶联缓冲液是 0.005M ~ 1M 的 pH7.0 ~ 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液,或者是 0.005M ~ 1M 的 pH9.0 ~ 11.0 的碳酸盐缓冲液,或者是 0.005M ~ 1M 的 pH5.6 的醋酸盐缓冲液,或者是 0.005M ~ 1M 的 pH3.0 ~ 7.0 的柠檬酸盐缓冲液,或者是 0.005M ~ 1M 的 pH7.0 ~ 9.0 的 TBS 缓冲液,或者是 0.005M ~ 1M 的 pH3.0 ~ 7.0 的 TE 缓冲液,或者是 0.5× ~ 10× 的 pH5.0 ~ 8.0 的 PBS 缓冲液;

所述清洗缓冲液为含 0.02 ~ 0.2%吐温的上述偶联缓冲液;

所述封闭剂是偶联缓冲液与 1% ~ 10%外加成份的混合溶液,外加成份是牛血清白蛋白、赖氨酸、脱脂奶粉、乙醇胺和动物血清中的一种或多种的混合物;

所述反应缓冲液是 0.005M ~ 1M 的 pH7.0 ~ 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液;

所述洗脱缓冲液是 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的 Gly-HCl 缓冲液或者 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的柠檬酸盐缓冲液,0.1M ~ 10M 的尿素;

所述再生缓冲液是 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的 Gly-HCl 缓冲液或者 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的柠檬酸盐缓冲液,或者 0.1M ~ 10M 的尿素;

所述保存缓冲液是上述偶联缓冲液或者是上述偶联缓冲液与防腐剂、保护剂的混合溶液,所述防腐剂是 0.01 ~ 0.1%的叠氮钠或者 0.01 ~ 0.1%的硫柳汞,所述保护剂是 0.05 ~ 1% BSA 或者 0.05 ~ 1%的动物血清或者 0.05% ~ 1%的蛋白酶抑制剂。

## 一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于磁性微粒进行免疫沉淀反应的方法。

### 背景技术

[0002] 免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 是以抗体-抗原的特异性亲和作用为基础, 用于沉淀或分离纯化目的蛋白, 或研究蛋白质, DNA 或 RNA 与目的蛋白质的相互作用的方法。其原理是: 在血浆/清, 脑髓液, 唾液、腹水、组织培养物, 杂交瘤上清和细胞裂解液中, 有许多蛋白质-蛋白质, DNA-蛋白质, RNA-蛋白质间的相互作用, 如果用目的蛋白的抗体免疫沉淀目的蛋白, 那么与目的蛋白在体内结合的物质也能沉淀下来。这种方法包括用来分离生物样本中的已知特定蛋白质的个别免疫沉淀法 (IP); 用于研究整个蛋白质复合体, 测定两种目标蛋白质是否在体内结合, 确定一种特定蛋白质的新作用搭档的免疫共沉淀法 (Co-IP); 用来研究与 DNA 结合的蛋白质的染色质免疫沉淀法 (ChIP); 用来研究与 RNA 结合的蛋白质的 RNA 免疫沉淀法 (RIP)。

[0003] 免疫沉淀试验的方法是在生物样品中先加入抗体免疫沉淀反应后再加进固定了蛋白 A/G 的载体分离, 或加入固定了抗体的载体进行免疫沉淀反应后分离。

[0004] 目前现有的以琼脂糖凝胶微粒为载体的方法, 需要经过层析、离心等步骤。层析柱需要一定的活化时间及前处理步骤, 并且所需反应体积较大, 之后还需样品的浓缩, 对小体积样品处理时不能得到理想的结果, 同时离心的方法耗时耗力且容易造成样品损失。而现有技术中以金磁微粒为载体的免疫沉淀方法是通过对抗体采用共价偶联的方法固定到载体上, 虽然可以实现免疫沉淀试验的目的, 但存在非特异性结合、重现性差, 同时抗体的活性造成了一定的损失, 选择种类少的问题。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法, 其解决了现有免疫沉淀方法中有非特异性结合、重现性差的问题。

[0006] 本发明的技术解决方案是:

[0007] 本发明基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法, 它的实现步骤包括:

[0008] (1) 抗体的固定: 选取金磁微粒作为反应的固相载体, 将目标生物物质的特异性抗体直接偶联在金磁微粒的表面; 所述将目标生物物质的特异性抗体偶联在金磁微粒表面的方法包括:

[0009] (1.1) 金磁微粒预处理:

[0010] 取金磁微粒, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清; 加入偶联缓冲液, 轻摇重悬, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清, 即得到预处理好的金磁微粒;

[0011] (1.2) 偶联抗体:

[0012] 取目标生物物质的特异性抗体, 加入偶联缓冲液稀释, 再加入至预处理好的金磁微粒中, 置于摇床中, 0 ~ 37°C 条件下, 充分反应 10min ~ 30min, 磁性分离, 弃上清; 加入清

洗缓冲液,轻摇重悬,磁性分离,弃上清;加入保存缓冲液,2~8℃保存备用。

[0013] (2) 稀释目的生物样品:

[0014] 取目的生物样品,加入反应缓冲液稀释,保存备用。

[0015] (3) 免疫沉淀反应:

[0016] (3.1) 前处理:

[0017] 取上述步骤(1)中固定了目标生物物质的特异性抗体的金磁微粒,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;

[0018] (3.2) 反应:

[0019] 加入上述步骤(2)中稀释好的目的生物样品,混合均匀,0~37℃条件下,充分反应5min~60min,磁性分离,弃上清,即为含有免疫沉淀复合物的磁性微粒复合物;

[0020] (4) 免疫沉淀复合物的洗脱:

[0021] 取上述步骤(3.2)中的磁性微粒复合物,加入洗脱缓冲液,混合均匀,0~37℃条件下,充分反应5min~60min,磁性分离,移取分离后上清,即为所需的免疫沉淀复合物。

[0022] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,它的实现步骤还包括目标生物物质的特异性抗体的亲和配体的固定:

[0023] 在将目标生物物质的特异性抗体加入预处理好的金磁微粒中偶联之前,先加入目标生物物质的特异性抗体的亲和配体,0~37℃条件下,充分反应10min~30min,磁性分离,弃上清;再加入清洗缓冲液清洗,磁性分离,弃上清

[0024] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,所述方法包括磁性微粒的再生和保存步骤:

[0025] 用再生缓冲液清洗上述步骤(3.2)免疫反应后的金磁微粒,将吸附到金磁微粒上的目标生物物质的特异性抗体从金磁微粒上洗脱下来,得到再生后的金磁微粒,再加入保存缓冲液,2℃~8℃保存备用。

[0026] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于,所述方法还包括金磁微粒的封闭步骤:

[0027] 在步骤(1.2)金磁微粒与目标生物物质的特异性抗体固定之后,步骤(3)免疫沉淀反应之前,先加入封闭剂,在0~37℃条件下,摇床中充分反应2h,磁性分离,弃上清;再加入清洗缓冲液清洗,磁性分离,弃上清,重复清洗至少三次。

[0028] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:所述的目标生物物质的特异性抗体的亲和配体为蛋白A或蛋白G。

[0029] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:所述目的生物样品是血清、血浆、脑脊液、细胞裂解液;所述目标生物物质包括蛋白质,DNA,RNA,细菌,细胞;所述目标生物物质的抗体包括相应生物物质的抗体或者多肽;所述免疫沉淀复合物包括蛋白与蛋白的复合物,DNA与蛋白的复合物,RNA与蛋白的复合物,细菌与蛋白的复合物。

[0030] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于:所述偶联缓冲液是0.005M~1M的pH7.0~9.0的Tris-HCl缓冲液,或者是0.005M~1M的pH9.0~11.0的碳酸盐缓冲液,或者是0.005M~1M的pH5.6的醋酸盐缓冲液,或者是0.005M~1M的pH3.0~7.0的柠檬酸盐缓冲液,或者是0.005M~1M的pH7.0~9.0的TBS缓冲液,或者是0.005M~1M的pH3.0~7.0的TE缓冲液,或者是0.5×~10×的pH5.0~8.0的PBS

缓冲液；

[0031] 所述清洗缓冲液为含 0.02 ~ 0.2%吐温的上述偶联缓冲液；

[0032] 所述封闭剂是偶联缓冲液与 1% ~ 10%外加成份的混合溶液,外加成份是牛血清白蛋白、赖氨酸、脱脂奶粉、乙醇胺和动物血清中的一种或多种的混合物；

[0033] 所述反应缓冲液是 0.005M ~ 1M 的 pH7.0 ~ 9.0 的 Tris-HCl 缓冲液；

[0034] 所述洗脱缓冲液是 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的 Gly-HCl 缓冲液或者 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的柠檬酸盐缓冲液,0.1M ~ 10M 的尿素；

[0035] 所述再生缓冲液是 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的 Gly-HCl 缓冲液或者 0.01M ~ 1M 的 pH2 ~ 5 的柠檬酸盐缓冲液,0.1M ~ 10M 的尿素；

[0036] 所述保存缓冲液是上述偶联缓冲液或者是上述偶联缓冲液与防腐剂、保护剂的混合溶液,所述防腐剂是 0.01 ~ 0.1%的叠氮钠或者 0.01 ~ 0.1%的硫柳汞,所述保护剂是 0.05 ~ 1% BSA 或者 0.05 ~ 1%的动物血清或者 0.05% ~ 1%的蛋白酶抑制剂。

[0037] 上述的基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法,其特征在于：

[0038] 所述目标生物物质的特异性抗体与金磁微粒是在 0 ~ 37℃、10 ~ 180r/min 的摇床中进行反应 10 ~ 40min；

[0039] 所述免疫沉淀反应是在 0 ~ 37℃、10 ~ 180r/min 的摇床中进行反应 10 ~ 40min；

[0040] 所述免疫沉淀复合物的洗脱是在 0 ~ 37℃、10 ~ 180r/min 的摇床中进行 10 ~ 40min；

[0041] 所述目标生物物质的特异性抗体的亲和配体的固定是在 0 ~ 37℃、10 ~ 180r/min 的摇床中进行 10 ~ 40min；

[0042] 所述金磁微粒的封闭是在 0 ~ 37℃、10 ~ 180r/min 的摇床中进行 10 ~ 40min。

[0043] 本发明的优点是：

[0044] 1. 特异性好,重现性好

[0045] 本发明先将抗体偶联在磁粒上,或通过特异性抗体的亲和配体(蛋白 A/G)偶联在磁粒上,确保了共沉淀的目的生物物质是由所加入的抗体沉淀得到的,有助于避免污染的发生,消除非特异结合的背景,得到更加一致的结果,重现性好。

[0046] 2. 步骤简化

[0047] 本发明方法不需要前处理,直接对血清 / 浆等生物样品用缓冲液进行适度倍数的稀释即可进行相应的步骤;而且本发明方法不需要对偶联抗体所用的载体基质即金磁微粒进行使用前的活化处理及离心操作,可直接使用,操作方便快捷,缩短了所需时间,也无需使用昂贵的实验仪器。

[0048] 3. 选择种类多,活性损失较小

[0049] 选择种类多,既可以用固定化蛋白 A/G 的金磁微粒偶联抗体,也可以直接非共价偶联任何种类的抗体(包括鸡 IgY)来进行免疫沉淀反应。由于抗体是通过蛋白 A/G 或直接通过非共价作用偶联在金磁微粒上的,其活性损失较小。

[0050] 4. 洗脱目标物质多

[0051] 由于目标物质抗体的选择种类多,因此使更多的抗原被洗脱下来。可用于小规模纯化,比其他免疫沉淀法得到更多的目标蛋白质。

[0052] 5. 通过再生步骤的处理,可实现重复使用。

[0053] 6. 生物样品损耗少。

#### 附图说明

[0054] 图 1 为金磁微粒对血清中白蛋白进行分离的样品所做的 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色电泳图, 其中:

[0055] 泳道 1 为实施列 1 分离得到的白蛋白样品的电泳图,

[0056] 泳道 2 为实施列 2 分离得到的样品的电泳图,

[0057] 泳道 3 为 marker 分子量标准 (14 ~ 97KD) 电泳图,

[0058] 泳道 4 为标准的白蛋白样品。

#### 具体实施方式

[0059] 实施例 1 是直接偶联抗体的金磁微粒从血清中分离白蛋白的具体过程:

[0060] 1] 人血清白蛋白抗体在金磁微粒表面的固定及金磁微粒的封闭: 取 4ml 金磁微粒到一个 5ml 容量的离心管中, 轻摇重悬, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清; 加入 4ml 偶联缓冲液, 轻摇重悬, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清, 重复操作一次, 即得到预处理好的金磁微粒; 将人血清白蛋白抗体用偶联缓冲液调节, 配制成浓度为 1mg/ml 的溶液, 取 1.5ml 加入预处理好的金磁微粒中, 在摇床中 37°C, 180r/min 反应 30min, 反应完毕, 磁性分离, 弃上清; 加入 4ml 清洗缓冲液, 轻摇重悬磁粒, 磁性分离, 弃上清; 加入 4ml 的封闭剂, 在摇床中 37°C, 180r/min 反应 2h; 再用 4ml 的清洗缓冲液清洗 3 次; 最后悬于 2ml 保存缓冲液中, 2 ~ 8°C 保存备用。

[0061] 2] 血清 / 浆等生物样品中白蛋白的分离:

[0062] a. 血清 / 浆等生物样品稀释: 取 5  $\mu$ l 血清 / 浆等生物样品, 用反应缓冲液稀释至 100  $\mu$ l。

[0063] b. 将 1] 步骤处理后的金磁微粒置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清; 加入 a 步骤中稀释好的血清 / 浆等生物样品, 在摇床中 37°C, 180r/min 反应 30min, 白蛋白就被结合到亲和配基上, 磁性分离, 弃上清, 从而实现白蛋白从血清 / 浆等生物样品中的去除, 在移取磁性分离后的上清后, 即为去除了白蛋白的样品。

[0064] 3] 白蛋白的洗脱: 加入 3ml 洗脱缓冲液 (0.05M, pH3.5 的 Gly-HCl 缓冲液) 到上步骤反应后的金磁微粒中, 在摇床中 37°C, 180r/min 反应 2min, 将吸附到金磁微粒上的白蛋白从金磁微粒上洗脱下来, 磁性分离, 弃上清。

[0065] 4] 金磁微粒的再生和保存: 在上述步骤 2] 分离了白蛋白的磁性微粒中加入 4ml 的再生缓冲液清洗, 轻摇重悬, 磁性分离, 弃上清; 加入 2ml 的保存缓冲液 2 ~ 8°C 保存备用。

[0066] 实施例 2 是经固定化的蛋白 A 偶联了抗体的金磁微粒从血清中分离白蛋白的具体过程:

[0067] 1] 蛋白 A 在金磁微粒表面的固定及金磁微粒的封闭: 取 1ml 金磁微粒悬液加入到一个 2ml 容量的离心管中, 轻摇重悬, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清; 加入 1ml 偶联缓冲液 (0.2M 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液), 轻摇重悬, 置于磁性分离器上, 磁性分离, 弃上清, 重复操作一次; 将蛋白 A 配置成浓度为 1mg/ml 的溶液, 取 100 ~ 200  $\mu$ l 加入金磁微粒

中,在摇床中 37°C,180r/min 反应 30min,反应完毕,磁性分离,弃上清;加入 1ml 清洗缓冲液(含 0.1%吐温的 pH6.0 的 PBS 缓冲液),轻摇重悬,磁性分离,弃上清;加入 1ml 的封闭剂(含 1%牛血清白蛋白和 1%赖氨酸的偶联缓冲液),在摇床中 37°C,180r/min 反应 2h;用 2ml 的上述清洗缓冲液清洗 3 次,最后悬于 1ml 保存缓冲液(含 0.1%叠氮钠和 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液)中,2~8°C 保存备用。

[0068] 2] 人血清白蛋白抗体在金磁微粒表面的固定及金磁微粒的封闭:取 4ml 金磁微粒到一个 5ml 容量的离心管中,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;加入 4ml 偶联缓冲液,轻摇重悬,置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清,重复操作一次,即得到预处理好的金磁微粒;将人血清白蛋白抗体用偶联缓冲液调节,配制成浓度为 1mg/ml 的溶液,取 1.5ml 加入预处理好的金磁微粒中,在摇床中 37°C,180r/min 反应 30min,反应完毕,磁性分离,弃上清;加入 4ml 清洗缓冲液,轻摇重悬磁粒,磁性分离,弃上清;加入 4ml 的封闭剂,在摇床中 37°C,180r/min 反应 2h;再用 4ml 的清洗缓冲液清洗 3 次;最后悬于 2ml 保存缓冲液中,2~8°C 保存备用。

[0069] 3] 血清/浆等生物样品中白蛋白的分离:

[0070] a. 血清/浆等生物样品的稀释:取 5 $\mu$ l 血清/浆等生物样品,用去除缓冲液(pH6.0 的 1 $\times$ PBS 缓冲液)稀释至 50 $\mu$ l。

[0071] b. 将上述 2] 步骤中处理后的蛋白 A 磁性微粒置于磁性分离器上,磁性分离,弃上清;加入 a 步骤中稀释好的血清/浆等生物样品,在摇床中 37°C,180r/min 反应 30min,白蛋白就被结合到亲和配基上,磁性分离,弃上清,从而实现白蛋白从血清/浆等生物样品中的去除,在移取磁性分离后的上清后,即为去除了白蛋白的样品。

[0072] 4] 白蛋白的洗脱:加入 1ml 洗脱缓冲液(0.05M, pH3.5 的 Gly-HCl 缓冲液)到上步骤反应后的金磁微粒中,在摇床中 37°C,180r/min 反应 2min,将吸附到金磁微粒上的白蛋白从金磁微粒上洗脱下来,磁性分离,弃上清。

[0073] 5] 金磁微粒的再生和保存:在上述步骤 2] 分离了白蛋白的磁性微粒中加入 1ml 的再生缓冲液清洗,轻摇重悬,磁性分离,弃上清;加入 1ml 的保存缓冲液 2~8°C 保存备用。

[0074] 从图 1 可以看出,泳道 1、泳道 2 与泳道 4 相比,蛋白条带在相同位置出现,说明免疫沉淀试验分离得到了白蛋白,且特异性很好。

[0075] 本发明的技术方案不局限于上述实施例,所述生物样品还可以是血清、血浆、脑脊液细胞裂解液;所述蛋白 A 还可以替换为蛋白 G;所述人血清白蛋白抗体不仅仅局限于可以和蛋白 A/G 结合的抗体,还包括了禽类的抗体。



图 1

专利名称(译)	一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101726603A</a>	公开(公告)日	2010-06-09
申请号	CN200910254442.8	申请日	2009-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	陕西北美基因股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	西安金磁纳米生物技术有限公司		
[标]发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
发明人	崔亚丽 胡佳 陈超		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	徐平		
其他公开文献	CN101726603B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种基于金磁微粒进行免疫沉淀反应的方法，属于免疫沉淀领域，该免疫沉淀反应的方法是在生物样品中先加入抗体免疫沉淀反应后，再加进固定了蛋白A/G的载体分离，或在生物样品中加入固定了抗体的载体进行免疫沉淀反应后分离，其主要包括抗体的固定、免疫反应、洗脱步骤。它解决了现有免疫沉淀方法中有非特异性结合，可采用的抗体选择种类少，抗体活性损失大的问题，主要用来分离生物样本中的已知特定蛋白质的个别免疫沉淀法(IP)；用来研究整个蛋白质复合体；测定两种目标蛋白质是否在体内结合，确定一种特定蛋白质的新作用搭档的免疫共沉淀法(Co-IP)；用来研究与DNA结合的蛋白质的染色质免疫沉淀法(ChIP)；用来研究与RNA结合的蛋白质的RNA免疫沉淀法(RIP)等。

