



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107488713 A

(43)申请公布日 2017.12.19

(21)申请号 201710685116.7

(22)申请日 2017.08.11

(71)申请人 华中科技大学同济医学院附属同济
医院

地址 430030 湖北省武汉市硚口区解放大
道1095号同济医院泌尿外科

(72)发明人 胡霞 陈忠 李龙承 吴焕磊
李森茂

(74)专利代理机构 北京纽乐康知识产权代理事
务所(普通合伙) 11210

代理人 唐忠庆

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

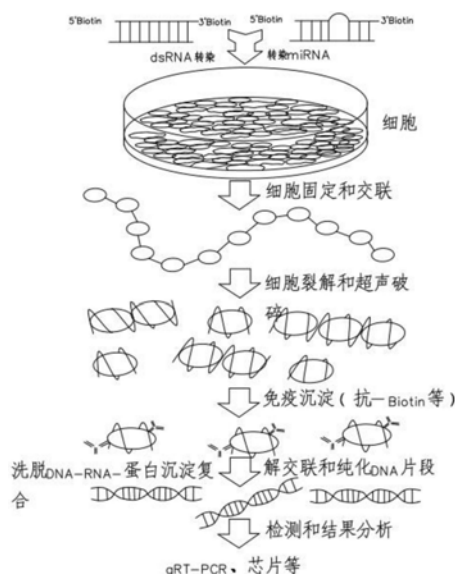
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法及
试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,其特征在于,包括如下成分:蛋白A+G琼脂糖/鲑鱼精DNA;甘氨酸溶液;染色质免疫共沉淀稀释缓冲液;洗涤缓冲液;0.5M EDTA;5M NaCl;1M三羟甲基氨基甲烷,pH6.5;SDS裂解缓冲液;生物素抗体;RNA酶抑制剂。本发明的有益效果:通过对传统的免疫共沉淀方法进行改进,从而得到靶向DNA-RNA复合物,进而可以研究和验证RNA与DNA之间的相互作用,本发明的另一方面还提供了相应的生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,方便科学研究者使用。



1. 一种生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,其特征在于,包括如下成分:

蛋白A+ G琼脂糖+鲑鱼精DNA;

甘氨酸溶液;

染色质免疫共沉淀稀释缓冲液;

洗涤缓冲液;

0.5M EDTA;

5M NaCl;

1M 三羟甲基氨基甲烷,pH 6.5;

SDS裂解缓冲液;

生物素抗体;

RNA酶抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,其特征在于,所述洗涤缓冲液包括:低盐免疫复合物洗涤缓冲液、高盐免疫复合物洗涤缓冲液、LiCl免疫复合物洗涤缓冲液及TE缓冲液。

3. 一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. RNA标记生物素后转染细胞;

S2. 培养细胞至预期发生目的RNA和基因组DNA结合的时间点,加入甲醛,孵育细胞;

S3. 收集细胞,将细胞裂解后进行超声处理,使DNA断裂成200-1000bp;

S4. 加入生物素抗体Biotin;

S5. 加入蛋白A,以沉淀抗体识别的蛋白或相应的复合物;

S6. 对沉淀下来的复合物进行洗涤,除去一些非特异性结合。

4. 根据权利要求3所述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,所述步骤S2和所述步骤S3之间,还包括洗涤细胞的步骤,具体操作方法为:加入5-10m冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS洗涤细胞,吸尽液体;再加入冰浴预冷的含1mM PMSF和50 U/ml RNA酶抑制剂的PBS 进一步洗涤细胞,吸尽液体。

5. 根据权利要求3所述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,所述步骤S3和所述步骤S4之间,还包括如下步骤:向超声处理后的样品中加入蛋白A+ G琼脂糖+鲑鱼精DNA,在4℃缓慢转动或摆动混匀30分钟。

6. 根据权利要求3所述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,所述步骤S3和所述步骤S4之间,还包括如下步骤:检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果。

7. 根据权利要求6述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,所述检测检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果包括如下步骤:向超声处理后的样品中加入5MNaCl以去除蛋白或RNA和基因组DNA之间的交联,通过酚氯仿抽提或DNA纯化试剂盒处理,获得的液体进行琼脂糖凝胶电泳。

8. 根据权利要求3所述的一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,其特征在于,所述S6中对沉淀下来的复合物进行洗涤包括如下步骤:使用低盐免疫复合物洗涤缓冲液、高盐免疫复合物洗涤缓冲液、LiCl免疫复合物洗涤缓冲液各洗涤一次,使用TE缓冲液洗涤两次。

一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及为分子生物学研究技术领域,具体来说,涉及一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法及试剂盒。

[0002]

背景技术

[0003] 分子间的相互作用是分子生物学的核心内容,目前蛋白与蛋白相互作用可以通过免疫共沉淀 (Co-IP) 及Pull-down等方法明确,蛋白与DNA相互作用可以通过染色质免疫共沉淀 (ChIP) 明确,蛋白与RNA可以通过RNA-免疫共沉淀 (RIP) 实现。上述方法均有相应试剂盒。但目前尚无DNA与RNA的相互作用研究方法,分子生物学中,DNA与RNA的相关作用非常常见,如何验证两者间的相互作用是本领域一直以来需要解决的技术问题。

[0004] 针对相关技术中的问题,目前尚未提出有效的解决方案。

[0005]

发明内容

[0006] 针对相关技术中的上述技术问题,本发明提出一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法及试剂盒,当预判RNA与靶向的DNA存在相互作用时,即可利用此方法进行验证,并且可以利用该方法开发相应的试剂盒用于分子生物学实验中,方法确信,收益可观。

[0007] 为实现上述技术目的,本发明的技术方案是这样实现的:

一种生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,包括如下成分:

Protein A+ G琼脂糖+鲑鱼精DNA;

甘氨酸溶液;

染色质免疫共沉淀稀释缓冲液;

洗涤缓冲液;

0.5M EDTA;

5M NaCl;

1M Tris,pH 6.5;

SDS裂解缓冲液;

RNA酶抑制剂。

[0008] 进一步地,所述洗涤缓冲液包括:低盐免疫复合物洗涤缓冲液、高盐免疫复合物洗涤缓冲液、LiCl免疫复合物洗涤缓冲液及TE缓冲液。

[0009] 根据本发明的另一方面,提供了一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法,包括如下步骤:

S1.RNA标记生物素后转染细胞;

S2.培养细胞至预期发生目的RNA和基因组DNA结合的时间点,加入甲醛,孵育细胞;

S3.收集细胞,将细胞裂解后进行超声处理,使DNA断裂成200-1000bp;

S4.加入生物素抗体Biotin;

S5.加入Protein A,以沉淀抗体识别的蛋白或相应的复合物;

S6.对沉淀下来的复合物进行洗涤,除去一些非特异性结合。

[0010] 进一步地,所述步骤S2和所述步骤S3之间,还包括洗涤细胞的步骤,具体操作方法为:加入5-10m冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS洗涤细胞,吸尽液体;再加入冰浴预冷的含1mM PMSF和50 U/ml RNA酶抑制剂的PBS 进一步洗涤细胞,吸尽液体。

[0011] 进一步地,所述步骤S3和所述步骤S4之间,还包括如下步骤:向超声处理后的样品中加入Protein A+ G琼脂糖/鲑鱼精DNA,在4℃缓慢转动或摆动混匀30分钟。

[0012] 进一步地,所述步骤S3和所述步骤S4之间,还包括如下步骤:检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果。

[0013] 进一步地,所述检测检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果包括如下步骤:向超声处理后的样品中加入5M NaCl以去除蛋白或RNA和基因组DNA之间的交联,通过酚氯仿抽提或DNA纯化试剂盒处理,获得的液体进行琼脂糖凝胶电泳。

[0014] 进一步地,所述S6中对沉淀下来的复合物进行洗涤包括如下步骤:使用低盐免疫复合物洗涤缓冲液、高盐免疫复合物洗涤缓冲液、LiCl免疫复合物洗涤缓冲液各洗涤一次,使用TE缓冲液洗涤两次。

[0015] 本发明的有益效果:通过对传统的免疫共沉淀方法进行改进,从而得到靶向DNA-RNA复合物,进而可以研究和验证RNA与DNA之间的相互作用,本发明的另一方面还提供了相应的生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,方便科学研究者使用。

[0016]

附图说明

[0017] 图1是常规染色质免疫共沉淀方法的流程图;

图2是本发明所述的生物素化的染色质免疫共沉淀方法的流程图;

图3是本发明实施例四中所述以dsRNA为例标记生物素的示意图;

图4是本发明实施例四中所述步骤3.5中检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果。

[0018]

具体实施方式

[0019] 下面将结合具体实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述,实施例中所使用的各种试剂、器械没有特殊说明均可以从商业途径获得。

[0020] 实施例一:试剂盒的构成及中英文对照

Protein A+G Agarose+Salmon Sperm DNA:蛋白A+ G琼脂糖+鲑鱼精DNA,(Millipore公司生产,17-295/17-371两个试剂盒内都有);

Glycine Solution (10×):甘氨酸溶液(10×),(碧云天公司,ST085);

ChIP Dilution Buffer:染色质免疫共沉淀稀释缓冲液,(Millipore公司,17-295/17-371两个试剂盒内都有);

Low Salt Immune Complex Wash Buffer:低盐免疫复合物洗涤缓冲液;

High Salt Immune Complex Wash Buffer:高盐免疫复合物洗涤缓冲液;

LiCl Immune Complex Wash Buffer:LiCl免疫复合物洗涤缓冲液;
TE Buffer:TE缓冲液;
0.5M EDTA(碧云天公司,ST066);
5M NaCl(可自配,称取292.5g NaCl,溶解于水中,稀释到1L即是5M NaCl);
1M Tris, pH 6.5:1M三羟甲基氨基甲烷,pH 6.5(北京雷根生物技术有限公司, NR0070);
SDS Lysis Buffer:SDS裂解缓冲液,(碧云天公司,P0013G);
生物素(Biotin)抗体(abcam公司 ab1227);
RNase inhibitor RNasin:RNA酶抑制剂,(Thermofisher, N8080119);
实施例二:实验所需的其他试剂及器械
生物素标记的小RNA(dsRNA或miRNA):(锐博生物可合成);
37%甲醛(工业用的甲醛,基本都可买到);
PBS:磷酸盐缓冲液,(碧云天公司,C0221A);
PMSF:苯甲基磺酰氟,(碧云天公司,ST505);
Tris平衡苯酚(碧云天公司,ST792);
氯仿(工业用,基本都可买到);
95%乙醇(基本都可买到);
70%乙醇(基本都可买到);
3M NaAc,pH5.2(碧云天公司,ST351);
细胞刮子(美国康宁,3008)。

[0021]

实施例三:实验步骤

3.1 RNA标记生物素后转染细胞

将作为研究对象的小RNA(dsRNA或miRNA)生物素化。

[0022]

3.2 培养细胞至预期发生目的蛋白和基因组DNA结合的时间点,加入甲醛,孵育细胞

A.准备适量冰浴预冷的PBS,以及100mM PMSF,将SDS Lysis Buffer适当温浴,使其中的SDS充分溶解,并混匀。

[0023] B.将细胞培养于10cm细胞培养皿中,细胞培养液的用量为10 ml。在预期发生目的RNA和基因组DNA结合的时间点,一般为转染后48-72小时(该时间点的选取参见参考文件1~3)。直接在细胞培养液中加入适量甲醛,轻轻混匀,至甲醛的最终浓度为1%。随即在37℃孵育10分钟,以交联生物素化的小RNA和相应的基因组DNA。

[0024] C.将有细胞样品的培养皿置于冰浴上,吸尽含甲醛和含Glycine Solution的培养液,尽量保持没有液体残留。

[0025] D.上述细胞样品室温放置5分钟,放置期间,用冰浴预冷的PBS稀释100mM PMSF至1mM,即配制成冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS。PMSF水性溶液一定要新鲜配制,其在水相中的半衰期约为30分钟。

[0026]

3.3 洗涤细胞

A. 向3.2步骤D室温放置完毕的细胞样品中加入5-10ml冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS, 洗涤细胞, 吸尽液体, 尽量保持没有液体残留。

[0027] B. 加入5-10ml冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS (包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin), 进一步洗涤细胞, 吸尽液体, 尽量保持没有液体残留。

[0028]

3.4 收集细胞, 将细胞裂解后进行超声处理, 使DNA断裂成200-1000bp

A. 加入1ml冰浴预冷的含1mM PMSF的PBS (包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin)用细胞刮子刮下细胞, 收集至离心管中。如果细胞可以用枪吹打下来, 也可以用枪吹打, 对细胞进行计数, 分装成每管大约100万细胞。

[0029] B. 4℃, 800-1000g离心1-2分钟, 以充分沉淀细胞, 如果发现沉淀不充分, 可以适当延长离心时间。吸尽上清, 尽量减少液体残留。

[0030] C. 配制适量含有1mM PMSF的SDS Lysis Buffer (包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin)。3.4步骤A中的100万细胞沉淀用0.2ml含有1mM PMSF的SDS Lysis Buffer重悬。

[0031] D. 在冰浴上孵育10分钟, 以充分裂解细胞。

[0032] E. 超声处理, 以剪切基因组DNA, 使DNA大部分断裂成200-1000bp大小, 如果能把大部分控制在400-800bp则更佳。

[0033]

3.5 检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果

A. 在0.2ml经过超声处理的样品中加入8微升5M NaCl, 混匀。65℃加热4小时, 以去除蛋白或RNA和基因组DNA之间的交联。

[0034] B. 加入等体积的Tris平衡苯酚, vortex剧烈混匀, 随后4℃, 12000g左右离心5分钟, 吸取上清至另一离心管中。

[0035] C. 加入等体积氯仿, vortex剧烈混匀, 随后4℃, 12000g左右离心5分钟。吸取上清至另一离心管中。

[0036] D. 取少量通过酚氯仿抽提 (或使用DNA纯化试剂盒进行纯化) 获得的液体, 对于酚氯仿抽提产物可以取5-10微升, 对于DNA纯化试剂盒纯化产物可以取2-5微升, 进行琼脂糖凝胶电泳, 观察超声处理对于基因组DNA的剪切效果, 该过程也需要加入终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin。

[0037]

3.6 染色质免疫沉淀样品预处理

A. 对于经过超声处理的样品在4℃, 12000-14000g离心5分钟。取上清 (约0.2ml) 至一2ml离心管中, 置于冰浴。

[0038] B. 配制适量含有1mM PMSF的ChIP Dilution Buffer (包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin), 向3.6步骤A中的2ml离心管中加入1.8ml含有1mM PMSF的ChIP Dilution Buffer以稀释经过超声处理的样品, 使最终体积为2毫升。

[0039] C. 取出20微升样品作为Input用于后续检测。其余近2ml样品加入70微升Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA (包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin), 70微升中约35微升为沉淀, 35微升为液体, 在4℃缓慢转动或摆动混匀30分钟。此步骤的目的

是减少Protein A+G Agarose/Salmon Sperm DNA和目的蛋白或目的DNA序列的非特异性结合。

[0040] D.4℃,1000g左右离心1分钟,将上清转移至一个新的2毫升离心管中。

[0041]

3.7加入生物素抗体Biotin

向3.6步骤D中的新的2毫升离心管中加入适量生物素抗体Biotin,一抗的用量可以参考抗体的说明书。

[0042]

3.8 加入Protein A,以沉淀抗体识别的蛋白或相应的复合物

加入60微升Protein A+G Agarose+Salmon Sperm DNA(包含终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin),60微升中约30微升为沉淀,30微升为液体,在4℃缓慢转动或摆动混匀60分钟,以沉淀一抗识别的蛋白或相应的复合物。

[0043]

3.9 对沉淀下来的复合物进行洗涤,除去一些非特异性结合

4℃,1000g左右离心1分钟。非常小心地去除液体,切勿触及沉淀。随后依次用如下溶液对沉淀进行洗涤,每次洗涤液的用量为1ml,每次在4℃缓慢转动或摆动洗涤3-5分钟,随后4℃,1000g左右离心1分钟。非常小心地去除液体,切勿触及沉淀。下述溶液每一次洗涤都需加入终浓度为50 U/ml的RNase inhibitor RNasin,防止降解。

[0044] 溶液1:低盐免疫复合物洗涤缓冲液洗涤一次。

[0045] 溶液2:高盐免疫复合物洗涤缓冲液洗涤一次。

[0046] 溶液3:LiCl免疫复合物洗涤缓冲液洗涤一次。

[0047] 溶液4:TE缓冲液洗涤两次。

[0048] 完成上述所有洗涤步骤后所获得的沉淀即可用于PCR扩增目的基因序列或用Southern检测目的基因序列等。

[0049]

实施例四:具体实施例的验证

按照上述实施例一和实施例二准备试剂,以及实施例三所述的实验步骤,申请人进行了若干次具体的实验,实验中所涉及的小RNA为miRNA mimic或小分子双链RNA,长度19-21nt,小RNA可以外源性合成(公司合成)。另外生物素可以在小RNA正义链3'或5'标记生物素(Biotin)(公司合成)。以dsRNA为例,转染过程如图3所示。

[0050] 申请人所选用的细胞系包括人前列腺癌、膀胱癌、骨肉瘤、乳腺癌等多个细胞系,将得到的最终沉淀用于多次后续实验,实验结果表明,使用本发明所述的生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒,按照本发明所述的生物素化的染色质免疫共沉淀方法,能够稳定得RNA与靶向DNA的复合物沉淀,重现性良好,能够稳定地用于PCR扩增目的基因序列,也可以准确地检测得到目的基因序列,后续实验结果也令人满意。

[0051] 步骤3.5中检测超声处理对于基因组DNA的剪切效果如图4所示。

[0052] 图4中,1为空白对照,2为阴性对照,5为内参,3、4、6、7为超声处理后的DNA样本,大体均为200bp大小。

[0053] 本发明所述的方法能够明确超声剪切DNA的效果,通过加入生物素抗体,可以沉淀

生物素标记的RNA与靶向DNA的复合物,方便研究人员进一步分析验证所得到的复合物。

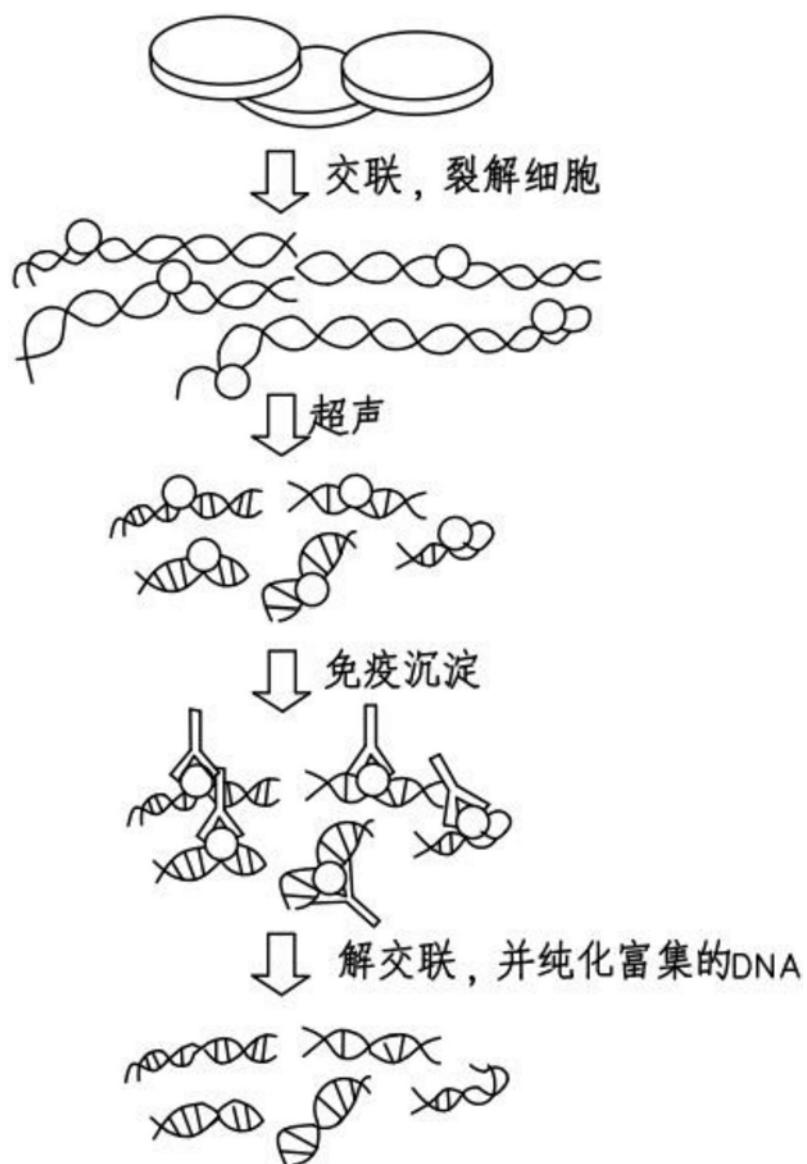


图1

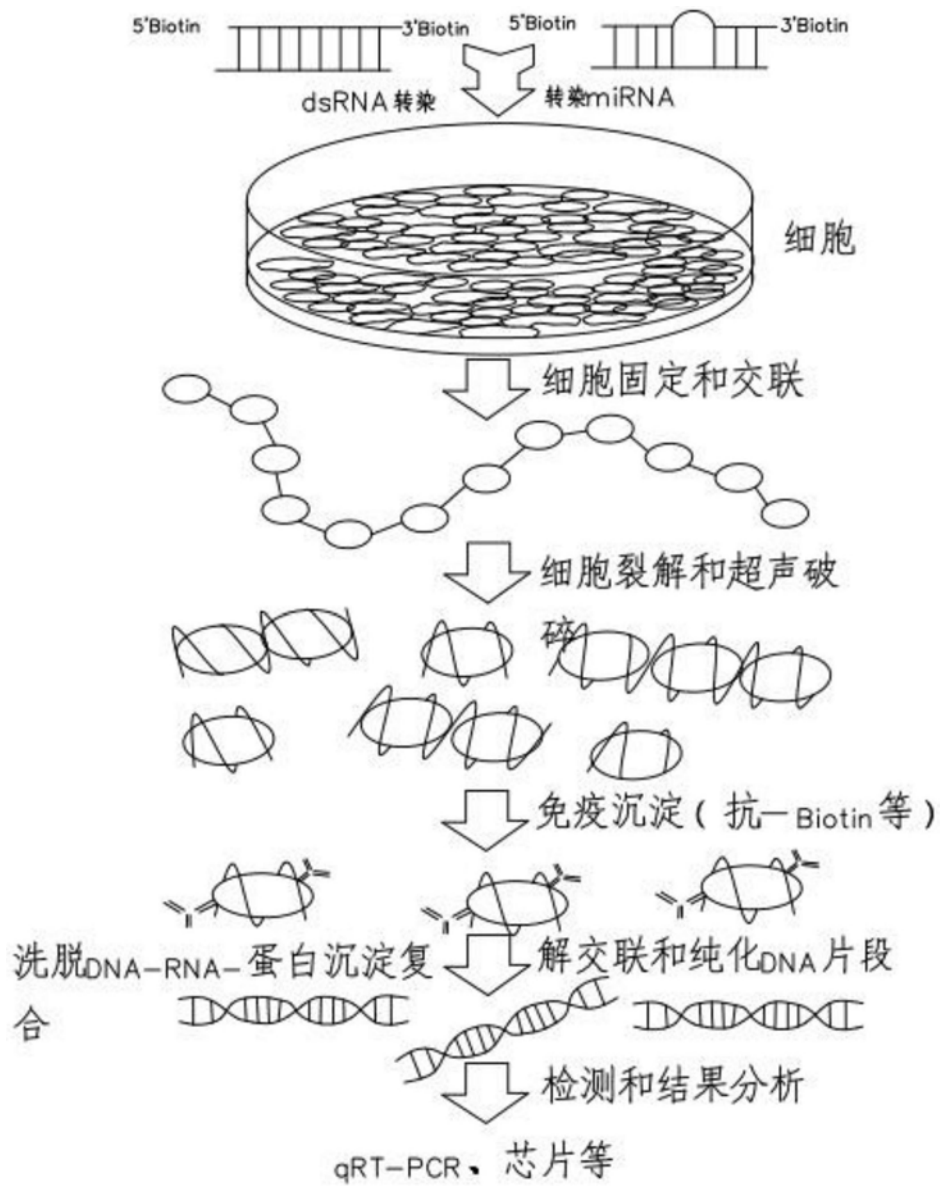


图2

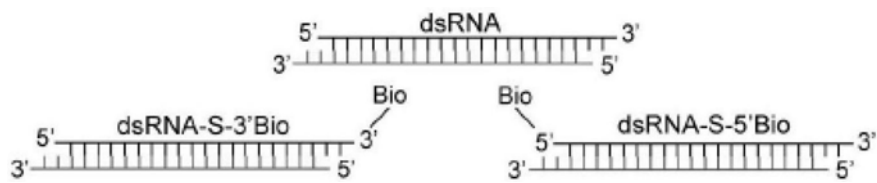


图3

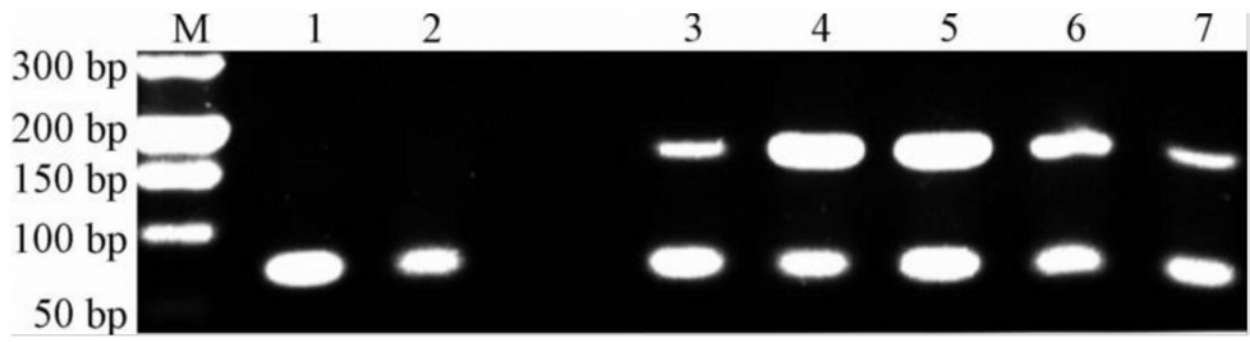


图4

专利名称(译)	一种生物素化的染色质免疫共沉淀方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN107488713A	公开(公告)日	2017-12-19
申请号	CN2017110685116.7	申请日	2017-08-11
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学同济医学院附属同济医院		
[标]发明人	胡赟 陈忠 李龙承 吴焕磊 李森茂		
发明人	胡赟 陈忠 李龙承 吴焕磊 李森茂		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6804 G01N33/5308		
代理人(译)	唐忠庆		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒，其特征在于，包括如下成分：蛋白A+G琼脂糖/鲑鱼精DNA；甘氨酸溶液；染色质免疫共沉淀稀释缓冲液；洗涤缓冲液；0.5M EDTA；5M NaCl；1M三羟甲基氨基甲烷，pH6.5；SDS裂解缓冲液；生物素抗体；RNA酶抑制剂。本发明的有益效果：通过对传统的免疫共沉淀方法进行改进，从而得到靶向DNA-RNA复合物，进而可以研究和验证RNA与DNA之间的相互作用，本发明的另一方面还提供了相应的生物素化的染色质免疫共沉淀试剂盒，方便科学研究者使用。

