



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109387624 A

(43)申请公布日 2019. 02. 26

(21)申请号 201710660252.0

(22)申请日 2017.08.04

(71)申请人 苏州同因生物科技有限公司

地址 215500 江苏省苏州市常熟高新技术
产业开发区湖山路333号同济科技广
场1幢2004

(72)发明人 李旦

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/561(2006.01)

权利要求书2页 说明书3页

(54)发明名称

一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方

(57)摘要

本发明涉及一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,本发明的有益成果为:本发明提供的一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,本发明的方法针对转录因子,进行免疫共沉淀实验,通过各种配方的分别测试,一一排查,最后得到合适的制取成分。

1. 一种转录因子免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方, 其特征在于, 包含以下内容:

1. RIPA Buffer 配制基础成分: Tris-HCl (缓冲液成分, 防止蛋白变性) NaCl (盐份, 防止非特异蛋白聚集) NP-40 (非离子去污剂, 提取蛋白; 用H₂O配制成10%储存液) 去氧胆酸钠 (离子去污剂, 提取蛋白; 用H₂O配制成10%储存液; 避光保存) 注意: 准备激酶 (致活酶) 实验时, 不要加去氧胆酸钠, 因为离子型去污剂能够使酶变性, 导致活性丧失。RIPA蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (PMSF) (用异丙醇配制成200mM的储存液, 室温保存) EDTA (钙螯合剂; 用H₂O配制成100mM的储存液, PH7.4) 亮抑酶肽 (Leupeptin) (用H₂O配制成1mg/ml的储存液, 分装, -20℃保存) 抑蛋白酶肽 (Aprotinin) (用H₂O配制成1mg/ml的储存液, 分装, -20℃保存) 胃蛋白酶抑制剂 (Pepstat in) (用甲醇配制成1mg/ml的储存液, 分装, -20℃保存) RIPA磷酸 (酯) 酶抑制剂激活的Na₃VO₄ (用H₂O配制成200mM的储存液) NaF (200mM的储存液, 室温保存) 注意: 在准备做磷酸 (酯) 酶实验的时候, 不加磷酸酯酶抑制剂;

2. 工作液配制配制100ml的modified RIPA buffer: 1) 称取790mg的Tris-Base, 加到75ml去离子水中, 加入900mg的NaCl, 搅拌, 直到全部溶解, 用HCl调节PH值到7.42) 加10ml 10%的NP-403) 加2.5ml 10%的去氧胆酸钠, 搅拌, 直到溶液澄清4) 加1ml 100mM的EDTA, 用量筒定容到100ml, 2-8℃保存5) 理论上, 蛋白酶和磷酸酯酶抑制剂应该在使用当天同时加入 (抑蛋白酶肽, 亮抑酶肽, 胃蛋白酶抑制剂各100μl; PMSF, Na₃VO₄, NaF各500μl), 但是PMSF在水溶液中很不稳定, 30分钟就会降解一半, 所以PMSF应该在使用前现加, 其他抑制剂成分可以在水溶液中稳定5天。

各种成分在工作液中的终浓度: a. Tris-HCl: 50mM, pH 7.4 b. NP-40: 1% c. 去氧胆酸钠: 0.25% d. NaCl: 150mM e. EDTA: 1mM f. PMSF: 1mM g. 抑蛋白酶肽, 亮抑酶肽, 胃蛋白酶抑制剂: 各1μg/ml h. Na₃VO₄: 1mM i. NaF: 1mM

实验步骤准备工作:

1. 预冷PBS, RIPA Buffer, 细胞刮子 (用保鲜膜包好后, 埋冰下), 离心机;
2. 用预冷的PBS洗涤细胞两次, 最后一次吸干PBS;
3. 加入预冷的RIPA Buffer (1ml/107个细胞、10cm培养皿或150cm²培养瓶, 0.5ml/5×106个细胞、6cm培养皿、75cm²培养瓶);
4. 用预冷的细胞刮子将细胞从培养皿或培养瓶上刮下, 把悬液转到1.5EP管中, 4℃, 缓慢晃动15min (EP管插冰上, 置水平摇床上);
5. 4℃, 14000g离心15min, 立即将上清转移到一个新的离心管中;
6. 准备Protein A agarose, 用PBS洗两遍珠子, 然后用PBS配制成50%浓度, 建议减掉枪尖部分, 避免在涉及琼脂糖珠的操作中破坏琼脂糖珠;
7. 每1ml总蛋白中加入100μl Protein A琼脂糖珠 (50%), 4℃摇晃10min (EP管插冰上, 置水平摇床上), 以去除非特异性杂蛋白, 降低背景;
8. 4℃, 14000g离心15min, 将上清转移到一个新的离心管中, 去除Protein A珠子;
9. (Bradford法) 做蛋白标准曲线, 测定蛋白浓度, 测前将总蛋白至少稀释1:10倍以上, 以减少细胞裂解液中去垢剂的影响 (定量, 分装后, 可以在-20℃保存一个月);
10. 用PBS将总蛋白稀释到约1μg/μl, 以降低裂解液中去垢剂的浓度, 如果兴趣蛋白在细胞中含量较低, 则总蛋白浓度应该稍高 (如10μg/μl);
11. 加入一定体积的兔抗到500μl总蛋白中, 抗体的稀释比例因兴趣蛋白在不同细胞系

中的多少而异;

12. 4℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温2h, 激酶或磷酸酯酶活性分析建议用2h室温孵育;

13. 加入100μl Protein A琼脂糖珠来捕捉抗原抗体复合物, 4℃缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温1h, 如果所用抗体为鼠抗或鸡抗, 建议加2μl“过渡抗体”(兔抗鼠IgG, 兔抗鸡IgG);

14. 14000rpm瞬时离心5s, 收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 去上清, 用预冷的RIPA buffer洗3遍, 800μl/遍, RIPA buffer有时候会破坏琼脂糖珠-抗原抗体复合物内部的结合, 可以使用PBS;

15. 用60μl 2×上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起, 轻轻混匀, 缓冲液的量依据上样多少的需要而定(60μl足够上三道);

16. 将上样样品煮5min, 以游离抗原, 抗体, 珠子, 离心, 将上清电泳, 收集剩余琼脂糖珠, 上清也可以暂时冻-20℃, 留待以后电泳, 电泳前应再次煮5min变性。

通过免疫共沉淀确定结合蛋白: 1. 用磷酸盐缓冲液洗30块10cm培养板上的适宜细胞。刮去每块板上的细胞到1ml冰冷的EBC裂解缓冲液中; 2. 将每毫升细胞悬液转移到微量离心管中, 在微量离心机上4℃以最大速度离心15min; 3. 收集上清(约30ml)并加入30μg的适当抗体, 4℃摇动免疫沉淀物1h; 4. 加入0.9ml的蛋白质A-Sepharose悬液, 4℃摇动免疫沉淀物30min; 5. 用含900mmol/L NaCl的NETN洗蛋白A-Sepharose混合物, 再重复洗5次。最后, 用NETN洗一次; 6. 吸出混合物的液体部分。加入800μl的1×SDS胶加样缓冲液到球珠中, 煮沸4min; 7. 将样品加入到大孔的不连续SDS-PAGE梯度胶中, 在10mA的恒定电流下电泳过夜; 8. 通过考马斯蓝染色观察蛋白质泳带; 9. 从胶上切下目标带, 将其放到微量离心管中, 用1ml 50%乙腈洗两次, 每次3min; 10. 用胰蛋白酶消化胶中的蛋白质, 再将肽电洗脱; 11. 通过窄孔高效液相色谱分离肽。将收集的肽在ABI 477A或494A机器上进行自动Edman降解测序。

一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,涉及一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方。

背景技术

[0002] 真核生物转录起始十分复杂,往往需要多种蛋白因子的协助,转录因子与RNA聚合酶Ⅱ形成转录起始复合体,共同参与转录起始的过程。根据转录因子的作用特点可分为二类;第一类为普遍转录因子,它们与RNA聚合酶Ⅱ共同组成转录起始复合体时,转录才能在正确的位置开始。除TFⅡD以外,还发现TFⅡA,TFⅡB,TFⅡF,TFⅡE,TFⅡH等,它们在转录起始复合体组装的不同阶段起作用。第二类转录因子为组织细胞特异性转录因子,这些TF是在特异的组织细胞或是受到一些类固醇激素\生长因子或其它刺激后,开始表达某些特异蛋白质分子时,才需要的一类转录因子。

发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明提供一种解决或部分解决上述问题的转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方。

[0004] 为达到上述技术方案的效果,本发明的技术方案为:一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,包含:

[0005] 1.RIPA Buffer配制基础成分:Tris-HCl(缓冲液成分,防止蛋白变性)NaCl(盐份,防止非特异蛋白聚集)NP-40(非离子去污剂,提取蛋白;用H₂O配制成10%储存液)去氧胆酸钠(离子去污剂,提取蛋白;用H₂O配制成10%储存液;避光保存)注意:准备激酶(致活酶)实验时,不要加去氧胆酸钠,因为离子型去污剂能够使酶变性,导致活性丧失。RIPA蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)(用异丙醇配制成200mM的储存液,室温保存)EDTA(钙螯合剂;用H₂O配制成100mM的储存液,PH7.4)亮抑酶肽(Leupeptin)(用H₂O配制成1mg/ml的储存液,分装,-20℃保存)抑蛋白酶肽(Aprotinin)(用H₂O配制成1mg/ml的储存液,分装,-20℃保存)胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)(用甲醇配制成1mg/ml的储存液,分装,-20℃保存)RIPA磷酸(酯)酶抑制剂激活的Na₃VO₄(用H₂O配制成200mM的储存液)NaF(200mM的储存液,室温保存)注意:在准备做磷酸(酯)酶实验的时候,不加磷酸酯酶抑制剂;

[0006] 3.工作液配制配制100ml的modified RIPA buffer:1)称取790mg的Tris-Base,加到75ml去离子水中,加入900mg的NaCl,搅拌,直到全部溶解,用HCl调节PH值到7.42)加10ml 10%的NP-403)加2.5ml 10%的去氧胆酸钠,搅拌,直到溶液澄清4)加1ml 100mM的EDTA,用量筒定容到100ml,2-8℃保存5)理论上,蛋白酶和磷酸酯酶抑制剂应该在使用当天同时加入(抑蛋白酶肽,亮抑酶肽,胃蛋白酶抑制剂各100μl;PMSF,Na₃VO₄,NaF各500μl),但是PMSF在水溶液中很不稳定,30分钟就会降解一半,所以PMSF应该在使用前现加,其他抑制剂成分可以在水溶液中稳定5天。

[0007] 各种成分在工作液中的终浓度:a.Tris-HCl:50mM,pH 7.4b.NP-40:1%c.去氧胆酸钠:0.25%d.NaCl:150mM e.EDTA:1mM f.PMSF:1mM g.抑蛋白酶肽,亮抑酶肽,胃蛋白酶

抑制剂:各1 μ g/ml h.Na₃VO₄:1mM i.NaF:1mM

[0008] 实验步骤准备工作:

[0009] 1.预冷PBS,RIPA Buffer,细胞刮子(用保鲜膜包好后,埋冰下),离心机;

[0010] 2.用预冷的PBS洗涤细胞两次,最后一次吸干PBS;

[0011] 3.加入预冷的RIPA Buffer(1ml/107个细胞、10cm培养皿或150cm²培养瓶,0.5ml/5 $\times$ 10⁶个细胞、6cm培养皿、75cm²培养瓶);

[0012] 4.用预冷的细胞刮子将细胞从培养皿或培养瓶上刮下,把悬液转到1.5EP管中,4 $^{\circ}$ C,缓慢晃动15min(EP管插冰上,置水平摇床上);

[0013] 5. 4 $^{\circ}$ C,14000g离心15min,立即将上清转移到一个新的离心管中;

[0014] 6.准备Protein A agarose,用PBS洗两遍珠子,然后用PBS配制成50%浓度,建议减掉枪尖部分,避免在涉及琼脂糖珠的操作中破坏琼脂糖珠;

[0015] 7.每1ml总蛋白中加入100 μ l Protein A琼脂糖珠(50%),4 $^{\circ}$ C摇晃10min(EP管插冰上,置水平摇床上),以去除非特异性杂蛋白,降低背景;

[0016] 8. 4 $^{\circ}$ C,14000g离心15min,将上清转移到一个新的离心管中,去除Protein A珠子;

[0017] 9.(Bradford法)做蛋白标准曲线,测定蛋白浓度,测前将总蛋白至少稀释1:10倍以上,以减少细胞裂解液中去垢剂的影响(定量,分装后,可以在-20 $^{\circ}$ C保存一个月);

[0018] 10.用PBS将总蛋白稀释到约1 μ g/ μ l,以降低裂解液中去垢剂的浓度,如果兴趣蛋白在细胞中含量较低,则总蛋白浓度应该稍高(如10 μ g/ μ l);

[0019] 11.加入一定体积的兔抗到500 μ l总蛋白中,抗体的稀释比例因兴趣蛋白在不同细胞系中的多少而异;

[0020] 12. 4 $^{\circ}$ C缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温2h,激酶或磷酸酯酶活性分析建议用2h室温孵育;

[0021] 13.加入100 μ l Protein A琼脂糖珠来捕捉抗原抗体复合物,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动抗原抗体混合物过夜或室温1h,如果所用抗体为鼠抗或鸡抗,建议加2 μ l“过渡抗体”(兔抗鼠IgG,兔抗鸡IgG);

[0022] 14. 14000rpm瞬时离心5s,收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物,去上清,用预冷的RIPA buffer洗3遍,800 μ l/遍,RIPA buffer有时候会破坏琼脂糖珠-抗原抗体复合物内部的结合,可以使用PBS;

[0023] 15.用60 μ l 2 $\times$ 上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起,轻轻混匀,缓冲液的量依据上样多少的需要而定(60 μ l足够上三道);

[0024] 16.将上样样品煮5min,以游离抗原,抗体,珠子,离心,将上清电泳,收集剩余琼脂糖珠,上清也可以暂时冻-20 $^{\circ}$ C,留待以后电泳,电泳前应再次煮5min变性。

[0025] 通过免疫共沉淀确定结合蛋白:1.用磷酸盐缓冲液洗30块10cm培养板上的适宜细胞。刮去每块板上的细胞到1ml冰冷的EBC裂解缓冲液中;2.将每毫升细胞悬液转移到微量离心管中,在微量离心机上4 $^{\circ}$ C以最大速度离心15min;3.收集上清(约30ml)并加入30 μ g的适当抗体,4 $^{\circ}$ C摇动免疫沉淀物1h;4.加入0.9ml的蛋白质A-Sepharose悬液,4 $^{\circ}$ C摇动免疫沉淀物30min;5.用含900mmol/L NaCl的NETN洗蛋白A-Sepharose混合物,再重复洗5次。最后,用NETN洗一次;6.吸出混合物的液体部分。加入800 μ l的1 $\times$ SDS胶加样缓冲液到球珠中,煮

沸4min;7.将样品加入到大孔的不连续SDS-PAGE梯度胶中,在10mA的恒定电流下电泳过夜;8.通过考马斯蓝染色观察蛋白质泳带;9.从胶上切下目标带,将其放到微量离心管中,用1ml 50%乙腈洗两次,每次3min;10.用胰蛋白酶消化胶中的蛋白质,再将肽电洗脱;11.通过窄孔高效液相色谱分离肽。将收集的肽在ABI 477A或494A机器上进行自动Edman降解测序。

[0026] 本发明的有益成果为:本发明提供的一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,本发明的方法针对转录因子,进行免疫共沉淀实验,通过各种配方的分别测试,一一排查,最后得到合适的制取成分。

具体实施方式

[0027] 为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行详细的说明。应当说明的是,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明,能够实现同样功能的产品属于等同替换和改进,均包含在本发明的保护范围之内。具体方法如下:

[0028] N末端是HIV-1 Tat蛋白的一个免疫优势表位,但是不同的条件下诱导出的抗N末端的抗体滴度差异较大。2005年文献报道,用ELISA方法未检测出HIV-1感染者血清与Tat1-20之间的反应,并且用Tat1-20免疫获得的兔抗血清中的抗该段多肽的抗体滴度明显低于用多肽Tat8-53免疫获得的兔抗血清;同样,用Tat1-20,8-53Tat19-53和Tat19-53m(即Tat第27,31和37位的半胱氨酸被甘氨酸替代)四种多肽或Tat1-20、Tat1-61和Tat44-61三种多肽的混合物免疫恒河猴,其抗血清与Tat1-20的反应弱于与Tat1-61或Tat8-53的反应,说明Tat1-20单独免疫或与其他多肽混合免疫都没有诱导出强的针对Tat N末端的免疫应答反应。我们的实验也得出类似的结果,只有抗全长Tat蛋白兔抗血清与Tat N末端合成肽s Tat1-21的反应性最强,并非所有含N末端的Tat抗原都能够诱导高滴度抗该区抗体,据此,我们推测:抗Tat N末端抗体的生可能与Tat N末端的空间构象有关,只有能够维持最适构象的Tat免疫原才能诱导产生高滴度的抗Tat N末端抗体。

[0029] 分别取全长Tat及其突变体融合蛋白5 μ g,以1:500稀释于50mM pH9.6的碳酸盐缓冲液,分别包被96孔酶标板,37 $^{\circ}$ C孵育2h。10%脱脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2h后,分别加入1:10稀释的不同艾滋病患者血清100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育45min,PBST洗液洗5次,加入1:1000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG-HRP(1:1000稀释)100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育45min后,PBST洗液洗5次,TMB显色液显色,于450nm波长处测定吸光度值(A₄₅₀),以高于阴性对照血清A₄₅₀平均值+2倍标准误(SD)的数值作为阳性判断标准。

[0030] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0031] 显然,本领域的技术人员可以对本发明实施例进行各种改动和变型而不脱离本发明实施例的精神和范围。这样,倘若本发明实施例的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

专利名称(译)	一种转录因子免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方		
公开(公告)号	CN109387624A	公开(公告)日	2019-02-26
申请号	CN201710660252.0	申请日	2017-08-04
[标]发明人	李旦		
发明人	李旦		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/561		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/561		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方，本发明的有益成果为：本发明提供一种转录因子免疫共沉淀(ChIP)试剂配方，本发明的方法针对转录因子，进行免疫共沉淀实验，通过各种配方的分别测试，一一排查，最后得到合适的制取成分。