



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109387623 A

(43)申请公布日 2019. 02. 26

(21)申请号 201710660025.8

(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 33/543(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方

(57)摘要

本发明涉及一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,包含五步,本发明的有益成果为:本发明提供一种组蛋白免疫共沉淀试剂配方,本发明的方法在经过实例研究后。本发明的配方会综合被检测者基因型和组蛋白信息,通过复杂的步骤保证试剂的质量。

1. 一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方, 其特征在于, 包含以下内容:

(1) 进行蛋白-DNA交联和裂解细胞: 用终浓度为1%甲醛溶液固定总数为 1×10^7 的K562细胞, 室温下放置10min, 甘氨酸溶液中止反应; 用预冷的PBS洗涤细胞两次, 离心去上清后加入1ml含蛋白酶抑制剂的SDS裂解液裂解细胞;

(2) 超声断裂染色质: 按优化好的条件 (100W, 每次超声10s, 共5次, 间隔30s) 断裂细胞裂解液中的染色质, 4℃下离心后保留上清;

(3) 免疫共沉淀: 超声处理后的溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠进行预清除, 离心后吸取1% (v/v) 上清留作Input溶液在剩余的上清中加入免疫共沉淀抗体, 包括阳性对照抗体 (anti-RNA Polymerase II, 1.0μg/管)、阴性对照抗体 (normal mouse Ig G, 1.0μg/管) 和目的抗体 (依抗体说明书推荐量: 抗ac H3抗体10μg/管, 抗ac H4抗体3μg/管), 在4℃摇床上孵育过夜, 次日溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠吸附免疫沉淀复合物, 短暂离心后去上清, 顺次用低盐、高盐、氯化锂和TE缓冲液清洗蛋白G-琼脂糖小珠;

(4) 免疫沉淀复合物洗脱: 用洗脱缓冲液洗脱免疫沉淀复合物, 同时在装有Input溶液的管中加入相同体积的洗脱缓冲液;

(5) 蛋白-DNA结合物解交联, 释放DNA: 加入5mol/L NaCl溶液, 65℃水浴孵育4-5h或过夜;

(6) 用DNA纯化柱回收DNA。

一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方

技术领域

[0001] 本发明涉及医学领域,涉及一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方。

背景技术

[0002] 免疫共沉淀 (ChIP) 是一种能真实反映细胞内组蛋白与DNA相互作用的实验技术。其原理是利用抗原抗体反应,通过用特异性抗体将目的蛋白及与之结合的DNA共同沉淀下来,再采用PCR、蛋白质分析技术、生物芯片技术等对目的DNA片段进行分析。组蛋白免疫共沉淀是表观遗传学研究的主要内容。

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组蛋白免疫共沉淀 (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:一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方,包含:

[0005] (1) 进行蛋白-DNA交联和裂解细胞:用终浓度为1%甲醛溶液固定总数为 1×10^7 的K562细胞,室温下放置10min,甘氨酸溶液中止反应;用预冷的PBS洗涤细胞两次,离心去上清后加入1ml含蛋白酶抑制剂的SDS裂解液裂解细胞;

[0006] (2) 超声断裂染色质:按优化好的条件(100W,每次超声10s,共5次,间隔30s)断裂细胞裂解液中的染色质,4℃下离心后保留上清;

[0007] (3) 免疫共沉淀:超声处理后的溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠进行预清除,离心后吸取1% (v/v) 上清留作Input溶液在剩余的上清中加入免疫共沉淀抗体,包括阳性对照抗体 (anti-RNA Polymerase II, 1.0μg/管)、阴性对照抗体 (normal mouse IgG, 1.0μg/管) 和目的抗体 (依抗体说明书推荐量:抗ac H3抗体10μg/管,抗ac H4抗体3μg/管),在4℃摇床上孵育过夜,次日溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠吸附免疫沉淀复合物,短暂离心后去上清,顺次用低盐、高盐、氯化锂和TE缓冲液清洗蛋白G-琼脂糖小珠;

[0008] (4) 免疫沉淀复合物洗脱:用洗脱缓冲液洗脱免疫沉淀复合物,同时在装有Input溶液的管中加入相同体积的洗脱缓冲液;

[0009] (5) 蛋白-DNA结合物解交联,释放DNA:加入5mol/L NaCl溶液,65℃水浴孵育4-5h或过夜;

[0010] (6) 用DNA纯化柱回收DNA。

[0011] 本发明的有益成果为:本发明提供一种组蛋白免疫共沉淀试剂配方,本发明的方法在经过实例研究后。本发明的配方会综合被检测者基因型和组蛋白信息,通过复杂的步骤保证试剂的质量。

具体实施方式

[0012] 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:

[0013] Ch IP的实验结果易受细胞数量多少、交联时长短超声片段大小、抗体的种类等多种因素影响,所以在做Ch IP实验时,必须做好实验对照,否则难以对实验结果的可靠性进行判断。交联后的DNA最好被断裂成200-1000bp大小的片段,以便暴露目标蛋白,利于抗体识别,超声波断裂染色质后,须按一定比例留取部分染色质溶液作为Input DNA用作内对照,用目的抗体沉淀蛋白-DNA复合物时,还应同时设立阳性抗体和阴性抗体对照,只有将目的抗体的结果与阳性及阴性抗体的结果互相比,才能得到正确结论。本实验中我们选择试剂盒厂家推荐的阳性和阴性抗体,Ch IP实验结束时经PCR鉴定,证实Ch IP实验获得成功。在采用Ch IP检测基因启动子区组蛋白修饰与转录关系的实验,Real-time PCR分析DNA样品时,考虑到目的抗体与非目的蛋白结合的可,还应设计一对引物扩增在实验对象中确定不表达的基因的启动子片段作为阴性对照。本实验的荧光定量PCR分析结果显,与G γ -和A γ -珠蛋白基因启子相比,作为阴性对照的necdin基因启动子ac H3、ac H4水平低下,证实本实验抗ac H3和抗ac H4抗体对目的蛋白-DNA复合物的特异性沉淀。

[0014] 详细的步骤为:

[0015] (1) 进行蛋白-DNA交联和裂解细胞:用终浓度为1%甲醛溶液固定总数为 1×10^7 的K562细胞,室温下放置10min,甘氨酸溶液中止反应;用预冷的PBS洗涤细胞两次,离心去上清后加入1ml含蛋白酶抑制剂的SDS裂解液裂解细胞;

[0016] (2) 超声断裂染色质:按优化好的条件(100W,每次超声10s,共5次,间隔30s)断裂细胞裂解液中的染色质,4℃下离心后保留上清;

[0017] (3) 免疫共沉淀:超声处理后的溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠进行预清除,离心后吸取1% (v/v) 上清留作Input溶液在剩余的上清中加入免疫共沉淀抗体,包括阳性对照抗体(anti-RNA Polymerase II,1.0 μ g/管)、阴性对照抗体(normal mouse IgG,1.0 μ g/管)和目的抗体(依抗体说明书推荐量:抗ac H3抗体10 μ g/管,抗ac H4抗体3 μ g/管),在4℃摇床上孵育过夜,次日溶液中加入蛋白G-琼脂糖小珠吸附免疫沉淀复合物,短暂离心后去上清,顺次用低盐、高盐、氯化锂和TE缓冲液清洗蛋白G-琼脂糖小珠;

[0018] (4) 免疫沉淀复合物洗脱:用洗脱缓冲液洗脱免疫沉淀复合物,同时在装有Input溶液的管中加入相同体积的洗脱缓冲液;

[0019] (5) 蛋白-DNA结合物解交联,释放DNA:加入5mol/L NaCl溶液,65℃水浴孵育4-5h或过夜;

[0020] (6) 用DNA纯化柱回收DNA。

[0021] 本发明的有益成果为:本发明提供一种组蛋白免疫共沉淀试剂配方,本发明的方法在经过实例研究后。本发明的配方会综合被检测者基因型和组蛋白信息,通过复杂的步骤保证试剂的质量。

[0022] 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。

[0023] 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)	一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方		
公开(公告)号	CN109387623A	公开(公告)日	2019-02-26
申请号	CN201710660025.8	申请日	2017-08-04
[标]发明人	李旦		
发明人	李旦		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方，包含五步，本发明的有益成果为：本发明提供一种组蛋白免疫共沉淀试剂配方，本发明的方法在经过实例研究后。本发明的配方会综合被检测者基因型和组蛋白信息，通过复杂的步骤保证试剂的质量。