

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
G01N 33/535
C12Q 1/68



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 03135400.9

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1182396C

[22] 申请日 2003.7.9 [21] 申请号 03135400.9
[71] 专利权人 杨清武
地址 400042 重庆市渝中区大坪长江支路 10
号大坪医院神经内科
[72] 发明人 杨清武
审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 重庆市恒信专利代理有限公司
代理人 涂 强

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法

[57] 摘要

一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法，它是将预先制备好的与相应转录因子特异结合的双链 DNA 通过核酸粘附液包被于酶链板孔中，然后加入待测样品，充分反应后，依次加入针对相应转录因子的单克隆抗体、辣根过氧化物酶 HRP 标记的 IgG 抗体，待分别充分反应后，依次加入显色液、终止液，再用酶联免疫检测仪测定其吸光度值，从而达到检测核转录因子活性的目的。在本发明中，DNA 的包被不需特殊的预活化试剂和特殊的表面，具有包被省时、检测过程简便、无需特殊的仪器设备、适合作高通量检测、无放射性污染、灵敏度高和定量准确等优点。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法，其步骤如下：

(1) 合成二条与相应转录因子特异结合的单链 DNA 序列，然后，进行退火，复性，形成 DNA 双链，再用核酸检测仪进行定量，并在 4℃ 条件下真空干燥；

(2) 利用核酸粘附液，将上述双链 DNA 配成 5~20pmol/ μ l 浓度，然后加入酶联板的板孔中，每孔 100~200 μ l，室温反应 1~2 小时后，将包被液倒出，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的双链 DNA 及粘附液充分洗涤掉，晾干备用；

(3) 每孔加入 50~100 μ l、含量为 2~20 μ g 细胞提取蛋白或组织提取蛋白，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的蛋白充分洗涤掉；

(4) 将针对相应转录因子的单克隆抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(5) 将辣根过氧化物酶 HRP 标记的 IgG 抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(6) 每孔加入 100~200 μ l 显色液，在 37℃ 条件下，反应 2~20 分钟；

(7) 每孔加入 100 μ l 反应终止液；

(8) 用酶联免疫仪测定在波长为 450nm 或 490nm，参考波长 655nm 时的吸光度值，一般要求 5 分钟内测完。

2.如权利要求 1 所述的以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法，其特征在于：利用核酸粘附液，将上述 (2) 中双链 DNA 配成 10pmol/ μ l 浓度，然后加入酶联板的板孔中，每孔 100 μ l，室温反应 1 小时，将包被液倒出，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次洗涤 3 分钟。

一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法

(一)、所属技术领域

本发明涉及一种生物实验检测方法，特别是一种检测核转录因子活性的方法。

(二)、技术背景

核转录因子 (Transcription factor) 是一种 DNA 结合蛋白，对多种基因的表达有强大的调节作用。现有研究较多的核转录因子有核因子- κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B)、AP-1 (c-Fos, FosB, 和 c-Jun)、CREB 等。它们一般由二个不同功能的结构域组成，即 DNA 结合结构域 (Binding domain, BD) 和转录活化结构域 (Activation domain, AD) 组成，前者主要负责与特异的 DNA 序列结合，后者具有转录激活活性，通过调节下游基因的表达来参与多种细胞功能的调节和信号转导。研究表明，核转录因子与多种细胞功能 (如细胞的增殖、分化等)、免疫调节、应激、炎症反应和多种疾病的发生、发展有关，是近年来上述领域研究的热点。越来越多的证据表明核转录因子活性的变化能明显反应细胞、组织的病理生理功能改变以及一些疾病的发生、发展进程。因此，转录因子的深入研究对揭示机体生理功能和疾病的检测、预防和治疗有重要意义。有些核转录因子 (如 NF- κ B) 已成为药物筛选的关键靶点，得到广泛关注。近年来，相关研究取得明显进展。但是目前转录因子活性的检测方法还相对落后，远不能满足方便、快速和高通量检测的需要，这在一定程度上限制了有关转录因子以及相关领域的研究进程。现有的检测核转录因子活性的常用方法有如下三种：

1. 凝胶迁移阻滞实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA): 该方法主要检测相关核转录因子结合特异 DNA 序列的能力。主要是将细胞的核抽提物与经放射素标记的双链寡核苷酸探针 (相应转录因子特异结合的核酸序列) 共同孵育一段时间后，通过聚

丙烯凝胶电泳和放射自显影的方法，检测转录因子与相应序列结合的能力。该方法具有敏感、特异的优点，是目前运用较多的方法，但却存在着如下的不足：（1）非常耗时，一般需要3天的时间；（2）有放射性污染；（3）更为突出的是不适合高通量检测，一次仅可做12个左右的样本；（4）结果为半定量，不准确。

2.基于报告基因分析的检测：如荧光素酶报告基因和 β -半乳糖苷酶报告基因等。其基本原理是将荧光素酶报告基因或 β -半乳糖苷酶报告基因人为构建在含待检测转录因子同源序列的启动子之后，然后再将该启动子构建在表达质粒上，利用基因转染的方法转染细胞后，通过检测报告基因的表达情况间接反应转录因子的活性。该方法具有敏感、适合高通量检测的优点，但却存在着如下的不足：（1）易受其他因素的干扰：细胞上存在的其他转录因子往往影响待检转录因子的表达水平；（2）同时该方法成功与否，还受带报告基因质粒转染效率高低的影晌；（3）结果定量误差太大。

3.免疫印迹法（Western blot）：与常规Western blot方法一样，利用相应抗体检测转录因子蛋白的表达情况来反应其活性的变化。该方法具有敏感和结果客观的优点，但却存在着如下的不足：（1）耗费时间，一般需要2~3天；（2）不合作高通量检测；（3）结果定量为半定量，不准确。

（三）、发明内容

本发明的目的就是提供一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法，该方法可以在很短的时间内进行高通量的核转录因子活性检测，且无放射性污染，具有灵敏度高、定量准确等特点。

本发明的目的是通过这样的技术方案实现的，它的步骤如下：

（1）合成二条与相应转录因子特异结合的单链DNA序列，然后，进行退火，复性，形成DNA双链，再用核酸检测仪进行定量，并在4℃条件下真空干燥；

（2）利用核酸粘附液，将上述双链DNA配成5~20pmol/ μ l浓度，然后加入酶联板的板孔中，每孔100~200 μ l，室温反应1~2小时后，将包

被液倒出，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的双链 DNA 及粘附液充分洗涤掉，晾干备用；

(3) 每孔加入 50~100 μ l、含量为 2~20 μ g 细胞提取蛋白或组织提取蛋白，在 37 $^{\circ}$ C 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的蛋白充分洗涤掉；

(4) 将针对相应转录因子的单克隆抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(5) 将辣根过氧化物酶 HRP 标记的 IgG 抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37 $^{\circ}$ C 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(6) 每孔加入 100~200 μ l 显色液，在 37 $^{\circ}$ C 条件下，反应 2~20 分钟；

(7) 每孔加入 100 μ l 反应终止液；

(8) 用酶联免疫仪测定在波长为 450nm 或 490nm，参考波长 655nm 时的吸光度值，一般要求 5 分钟内测完。

本专利所要求的技术方案中具体如下：

(1) 步中，是用核酸合成仪合成二条与相应转录因子特异结合的单链 DNA 序列，其单链 DNA 序列为已知序列，因检测的核转录因子不同而不同；加上退火、复性等方法均是生物技术领域成熟的方法，可以在自己实验室完成，也可由商业化公司完成；

(2) 步是本发明的核心内容，主要是利用核酸粘附液将双链 DNA 固定在酶联板上，核酸粘附液为一种特殊的 DNA 塑料表面包被试剂，目前已经商业化，由美国的 PIERCE 公司生产，使用时可以从相应代理公司购买，也可自己配制，具体配制方法见相关参考文献；

(3) 步中，涉及细胞提取蛋白或组织提取蛋白，是待检测组织或细胞的蛋白提取物，其提取方法为生物技术领域常用的成熟方法；磷酸盐缓冲液 PBS 为常规生化试剂，可参考有关试剂说明书进行配制；

(4)、(5) 步中，涉及的抗体稀释液为常规生化试剂，可参考有关试剂说明书进行配制；

(6) 步及 (7) 步中, 涉及的显色液和终止液均为常规生化试剂, 可参考有关试剂说明书进行配制;

(3) — (7) 的检测步骤均为常规的酶联免疫检测方法所涉及的步骤;

(8) 中, 检测选用的波长为 450nm 或 490nm, 参考波长 655nm, 是按常规酶联免疫检测方法要求的, 具体是因为专利要求的方案中 (5) 步是用辣根过氧化物酶 HRP 标记的 IgG 抗体, 以后经过显色液显色后, 在上述波长范围内检测最为敏感; 通过检测吸光度值的大小, 反映相应被检核转录因子活性的大小, 具体原理为: 因为待检测核转录因子活性的大小主要通过检测相应核转录因子与对应的特异序列的结合能力大小来反应的, 该专利要求的方案正是利用该原理, 首先用核酸粘附液将相应转录因子特异结合的 DNA 序列包被在酶联板孔中, 然后加入含对应转录因子的蛋白样品, 通过反应后, 转录因子就能与包被的 DNA 序列结合, 于后再加入对应转录因子的单克隆抗体, 通过反应后, 单抗能与相应的转录因子特异结合, 形成单抗-转录因子-DNA 特异序列结合的复合物, 再加入能与单克隆抗体特异结合的 HRP 标记的二抗, 利用显色剂显色反应后利用酶标仪检测吸光度值, 吸光度越大, 表明转录因子与对应 DNA 序列结合就越多, 同样其活性就越大。

由于采用了上述技术方案, 本发明具有如下的优点:

1. DNA 的包被不需特殊的预活化试剂和特殊的塑料表面 (一般实验室用的塑料表面即可);

2. 包被省时: 一般仅需 1 小时, 而其他包被方法至少需 12 小时左右;

3. 检测过程简便, 无需特殊的仪器设备, 省时, 仅需 4 小时左右;

4. 适合作高通量检测: 一次可做 96 个样品, 根据需要也可扩大检测的样本数, 如 192 个样品等, 特别适合作药物的大规模的筛选;

5. 无放射性污染;

6. 灵敏度高: 可以对 $0.5 \mu\text{g} \sim 50 \mu\text{g}$ 蛋白样品进行检测, 其灵敏度大约为 EMSA 方法的 10 倍左右;

7. 定量准确: 能对结果进行直接定量, 干扰因素少;

(四)、具体实施方式

下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明：

本发明的步骤如下：

(1) 合成二条与相应转录因子特异结合的单链 DNA 序列，然后，进行退火，复性，形成 DNA 双链，再用核酸检测仪进行定量，并在 4℃ 条件下真空干燥；

(2) 利用核酸粘附液，将上述双链 DNA 配成 5~20pmol/ μ l 浓度，然后加入酶联板的板孔中，每孔 100~200 μ l，室温反应 1~2 小时后，将包被液倒出，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的双链 DNA 及粘附液充分洗涤掉，晾干备用；

(3) 每孔加入 50~100 μ l、含量为 2~20 μ g 细胞提取蛋白或组织提取蛋白，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的蛋白充分洗涤掉；

(4) 将针对相应转录因子的单克隆抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(5) 将辣根过氧化物酶 HRP 标记的 IgG 抗体用抗体稀释液稀释成浓度为 1:1000~2000，然后每孔加入 100~200 μ l，在 37℃ 条件下，反应 1 小时，倒掉液体，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤，将未结合的抗体洗涤掉；

(6) 每孔加入 100~200 μ l 显色液，在 37℃ 条件下，反应 2~20 分钟；

(7) 每孔加入 100 μ l 反应终止液；

(8) 用酶联免疫仪测定在波长为 450nm 或 490nm，参考波长 655nm 时的吸光度值，一般要求 5 分钟内测完。

如上所述的利用核酸粘附液，将上述 (2) 中双链 DNA 配成 10pmol/ μ l 浓度，然后加入酶联板的板孔中，每孔 100 μ l，室温反应 1 小时，将包被液倒出，用磷酸盐缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次洗涤 3 分钟。

专利名称(译)	一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法		
公开(公告)号	CN1182396C	公开(公告)日	2004-12-29
申请号	CN03135400.9	申请日	2003-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	杨清武		
申请(专利权)人(译)	杨清武		
当前申请(专利权)人(译)	杨清武		
[标]发明人	杨清武		
发明人	杨清武		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/535		
代理人(译)	涂强		
其他公开文献	CN1477399A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种以酶联免疫方式检测核转录因子活性的方法，它是将预先制备好的与相应转录因子特异结合的双链DNA通过核酸粘附液包被于酶链板孔中，然后加入待测样品，充分反应后，依次加入针对相应转录因子的单克隆抗体、辣根过氧化物酶HRP标记的IgG抗体，待分别充分反应后，依次加入显色液、终止液，再用酶联免疫检测仪测定其吸光度值，从而达到检测核转录因子活性的目的。在本发明中，DNA的包被不需特殊的预活化试剂和特殊的表面，具有包被省时、检测过程简便、无需特殊的仪器设备、适合作高通量检测、无放射性污染、灵敏度高和定量准确等优点。