



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108181461 A

(43)申请公布日 2018.06.19

(21)申请号 201711463595.4

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 上海嘉因生物科技有限公司

地址 200000 上海市杨浦区国伟路135号10  
号楼305室

(72)发明人 李旦

(51)Int.Cl.

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

### (54)发明名称

应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫  
共沉淀优化方法

### (57)摘要

本发明涉及应用于组织样本中组蛋白修饰  
染色体免疫共沉淀优化方法,其特征在于,对组  
织样本依次进行破碎裂解、制备 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -APTS纳米  
磁珠、结合抗体、免疫共沉淀、洗脱处理,与现有  
技术相比,本发明能够在高通量水平上精准定位  
组蛋白的结合位点,提高临床样本的检测效果。

1. 本发明涉及应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 破碎裂解

用研钵在 $-10^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下将组织样本研成粉末,用 $4^{\circ}\text{C}$ 的PBS溶液洗所述组织样本2-3次;对每1g所述组织样本,加入0.5ml裂解液,裂解20-30分钟,将组织样本裂解液收集到EP管中,加入1ml组织匀浆缓冲液,使用组织匀浆器匀浆30s;将组织悬液置于 $15^{\circ}\text{C}$ 下,以1000rpm转速离心10分钟;放置3-4分钟,直至裂解液变清,避开上层漂浮的脂质层,取上清液 $4^{\circ}\text{C}$ ,以3000rpm转速离心45分钟,离心去上清;在每1g所述组织样本加入10mM甲醛150 $\mu\text{l}$ 在摇床上摇晃交联3-5分钟,加200 $\mu\text{l}$ 终止缓冲液,在摇床上摇晃5-10分钟终止交联;

以重量百分比计,所述裂解液包括0.05-0.2%的氯化铵、0.08-0.1%的氯化钠、0.03-1%的EDTA、0.002-0.01%的deoxicholate、0.002-0.01%的Leupeptin、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

以重量百分比计,所述组织匀浆缓冲液包括0.01-0.12%的Tris、0.01-0.1%的氯化钠、0.05-0.5%的NP40、0.002-0.2%的Aprotinin、0.002-0.2%的Leupeptin,余下部分为去离子水;

以重量百分比计,所述终止缓冲液包括0.05-0.20%的氯化钠、0.002-0.02%的碳酸氢铵、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

(2) 制备 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -APTS纳米磁珠

1) 溶剂热法制备三氧化二铁纳米球,直径为50-100nm;

2) 采用Stöber法,在所述三氧化二铁纳米球外包覆二氧化硅,得到所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ 纳米球,具体步骤为:称取5重量份步骤1)制备得到的三氧化二铁纳米球,向其中依次加入25重量份去离子水、45重量份无水乙醇和10重量份质量分数为5-15%的氨水,超声混合均匀后向混合液中加入10重量份正硅酸乙酯, $25^{\circ}\text{C}$ 下机械搅拌1小时;反应完毕后,将所得溶液离心,并依次用去离子水和乙醇清洗2-3次,将所得产物在 $50^{\circ}\text{C}$ - $75^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥待用;

3) 使用硅烷偶联剂氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷对步骤2)获得的 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ 纳米球进行硅烷化处理,得到 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -APTS;所述硅烷化具体步骤为:以细胞样本为100重量份:称取5重量份步骤2)得到的 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ 纳米球,加入到25重量份二甲基甲酰胺中,超声分散后得到溶液A;将15重量份的氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷和25重量份的二甲基甲酰胺混合均匀后,加入丁二酸酐使得混合溶液pH值维持在4-5,在 $50^{\circ}\text{C}$ - $75^{\circ}\text{C}$ 下机械搅拌3小时,得到溶液B;将所述溶液A、B混合后加入30重量份去离子水,在 $50^{\circ}\text{C}$ - $75^{\circ}\text{C}$ 下继续机械搅拌1小时后,将所得溶液离心,并依次用去离子水和乙醇清洗3次,制得硅烷化的 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -APTS纳米磁珠;

(4) 结合抗体

对应每1g所述组织样本,取1.5 $\mu\text{g}$ 组蛋白修饰抗体,在 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育20小时,然后用30-50 $\mu\text{l}$ 10mM Tris-HCl溶液洗涤3次,以1000rpm转速离心5分钟,取上清,转至低吸附的离心管中,加入所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -APTS纳米磁珠,置于 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下旋转,孵育3-5小时,保证所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -APTS纳米磁珠和组蛋白修饰抗体充分复合;

(5) 免疫共沉淀

对应每1g所述组织样本,在装有所述组织样本裂解液EP管中加入25 $\mu\text{l}$ 所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@SiO_2$ -

APTS纳米磁珠-抗体复合物,置于4℃条件下旋转,孵育3-5小时,让目标组蛋白与所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@$  $\text{SiO}_2$ -APTS纳米磁珠-抗体复合物结合;将所述组织样本裂解液EP管放在磁力架上,吸去上清;

(6) 洗脱

对应每1g所述组织样本,在装有所述组织样本裂解液EP管加入20 $\mu$ l的100mM氯化钠溶液,轻轻重悬所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@$  $\text{SiO}_2$ -APTS纳米磁珠-抗体复合物;40-50℃水浴加热10分钟;将所述EP管放在磁力架上,去除上清,用200 $\mu$ l4℃的0.5mMEDTA溶液洗涤1-2次,用200 $\mu$ l350mM氯化钠溶液洗涤2-3次,用200 $\mu$ l50mMTris-HCl溶液洗涤2-3次,以上洗涤每次10-15分钟;加50 $\mu$ l洗脱缓冲液在37℃洗脱30分钟,转上清至新的离心管中加2.5 $\mu$ g蛋白酶K,在50-75℃条件下解交联过夜;用150 $\mu$ l所述洗脱缓冲液在37℃洗脱所述 $\text{Fe}_2\text{O}_3@$  $\text{SiO}_2$ -APTS纳米磁珠-抗体复合物20-30分钟,溶出DNA;

以重量百分比计,所述洗脱缓冲液包括5-15%的氯化镁、10-20%的氯化钠、20-25%的乙二醇、0.001-0.01%的硫氰酸钠和0.5-0.2%SDS;余下部分为去离子水。

## 应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物学领域,具体涉及应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法。

### 背景技术

[0002] 免疫共沉淀是以抗体和抗原之间的专一性作用为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典方法。是确定两种蛋白质在完整细胞内生理性相互作用的有效方法。其基本原理是:细胞裂解液中缓冲溶液后在加入抗体,与抗原形成特异免疫复合物,经过洗脱,收集免疫复合物,然后进行SDS-PAGE及Westernblotting重量份分析。缓冲溶液具有盐平衡作用,可以破坏生物蛋白的结构及生物特性,同时具有调整pH的作用,对组蛋白与抗体的结合影响较大,使用合适配比成分的缓冲溶液能够实现组蛋白修饰染色体免疫共沉淀结果的优化。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明提供了应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法,其特征在于,包括如下步骤:

[0004] (1) 破碎裂解

[0005] 用研钵在-10℃冷冻条件下将组织样本研成粉末,用4℃的PBS溶液洗组织样本2-3次;对每1g组织样本,加入0.5ml裂解液,裂解20-30分钟,将组织样本裂解液收集到EP管中,加入1ml组织匀浆缓冲液,使用组织匀浆器匀浆30s;将组织悬液置于15℃下,以1000rpm转速离心10分钟;放置3-4分钟,直至裂解液变清,避开上层漂浮的脂质层,取上清液4℃,以3000rpm转速离心45分钟,离心去上清;在每1g组织样本加入10mM甲醛150ul在摇床上摇晃交联3-5分钟,加200ul终止缓冲液,在摇床上摇晃5-10分钟终止交联;

[0006] 以重量百分比计,裂解液包括0.05-0.2%的氯化铵、0.08-0.1%的氯化钠、0.03-1%的EDTA、0.002-0.01%的deoxycholate、0.002-0.01%的Leupeptin、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

[0007] 以重量百分比计,组织匀浆缓冲液包括0.01-0.12%的Tris、0.01-0.1%的氯化钠、0.05-0.5%的NP40、0.002-0.2%的Aprotinin、0.002-0.2%的Leupeptin,余下部分为去离子水;

[0008] 以重量百分比计,终止缓冲液包括0.05-0.20%的氯化钠、0.002-0.02%的碳酸氢铵、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

[0009] (2) 制备Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠

[0010] 1) 溶剂热法制备三氧化二铁纳米球,直径为50-100nm;

[0011] 2) 采用Stöber法,在三氧化二铁纳米球外包覆二氧化硅,得到Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球,具体步骤为:称取5重量份步骤1)制备得到的三氧化二铁纳米球,向其中依次加入25重量份去离子水、45重量份无水乙醇和10重量份质量分数为5-15%的氨水,超声混合均匀后向混合液中加入10重量份正硅酸乙酯,25℃下机械搅拌1小时;反应完毕后,将所得溶液离心,并

依次用去离子水和乙醇清洗2-3次,将所得产物在50℃-75℃烘箱中干燥待用;

[0012] 3) 使用硅烷偶联剂氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷对步骤2) 获得的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球进行硅烷化处理,得到Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS;硅烷化具体步骤为:以细胞样本为100重量份:称取5重量份步骤2) 得到的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球,加入到25重量份二甲基甲酰胺中,超声分散后得到溶液A;将15重量份的氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷和25重量份的二甲基甲酰胺混合均匀后,加入丁二酸酐使得混合溶液pH值维持在4-5,在50℃-75℃下机械搅拌3小时,得到溶液B;将溶液A、B混合后加入30重量份去离子水,在50℃-75℃下继续机械搅拌1小时后,将所得溶液离心,并依次用去离子水和乙醇清洗3次,制得硅烷化的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠;

[0013] (4) 结合抗体

[0014] 对应每1g组织样本,取1.5ug组蛋白修饰抗体,在4℃条件下孵育20小时,然后用30-50ul 10mM Tris-HCl溶液洗涤3次,以1000rpm转速离心5分钟,取上清,转至低吸附的离心管中,加入Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠,置于4℃条件下旋转,孵育3-5小时,保证Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠和组蛋白修饰抗体充分复合;

[0015] (5) 免疫共沉淀

[0016] 对应每1g组织样本,在装有组织样本裂解液EP管中加入25ul Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物,置于4℃条件下旋转,孵育3-5小时,让目标组蛋白与Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物结合;将组织样本裂解液EP管放在磁力架上,吸去上清;

[0017] (6) 洗脱

[0018] 对应每1g组织样本,在装有组织样本裂解液EP管加入20ul的100mM氯化钠溶液,轻轻重悬Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物;40-50℃水浴加热10分钟;将EP管放在磁力架上,去除上清,用200ul 4℃的0.5mMEDTA溶液洗涤1-2次,用200ul 350mM氯化钠溶液洗涤2-3次,用200ul 50mM Tris-HCl溶液洗涤2-3次,以上洗涤每次10-15分钟;加50ul洗脱缓冲液在37℃洗脱30分钟,转上清至新的离心管中加2.5ug蛋白酶K,在50-75℃条件下解交联过夜;用150ul洗脱缓冲液在37℃洗脱Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物20-30分钟,溶出DNA;

[0019] 以重量百分比计,洗脱缓冲液包括5-15%的氯化镁、10-20%的氯化钠、20-25%的乙二醇、0.001-0.01%的硫氰酸钠和0.5-0.2% SDS;余下部分为去离子水。

[0020] 本发明的有益成果为:本发明提供了应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法,与现有技术相比,本发明能够在高通量水平上精准定位组蛋白的结合位点,提高了临床样本的检测效果,具有广阔的市场前景和应用价值。

## 具体实施方式

[0021] 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:

[0022] 实施例1:

[0023] 以猪的肝组织为例

[0024] (1) 破碎裂解

[0025] 用研钵在-10℃冷冻条件下将猪的肝组织研成粉末,用4℃的PBS溶液洗猪的肝组织2-3次;在每1g猪的肝组织中加入0.5ml裂解液,裂解20-30分钟,将猪的肝组织裂解液收集到EP管中,加入1ml组织匀浆缓冲液,使用组织匀浆器匀浆30s;将组织悬液置于15℃下,以1000rpm转速离心10分钟;放置3-4分钟,直至裂解液变清,避开上层漂浮的脂质层,取上清液4℃,以3000rpm转速离心45分钟,离心去上清;在每1g猪的肝组织加入10mM甲醛150ul在摇床上摇晃交联3-5分钟,加200ul终止缓冲液,在摇床上摇晃5-10分钟终止交联;

[0026] 以重量百分比计,裂解液包括0.05-0.2%的氯化铵、0.08-0.1%的氯化钠、0.03-0.1%的EDTA、0.002-0.01%的deoxicholate、0.002-0.01%的Leupeptin、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

[0027] 以重量百分比计,组织匀浆缓冲液包括0.01-0.12%的Tris、0.01-0.1%的氯化钠、0.05-0.5%的NP40、0.002-0.2%的Aprotinin、0.002-0.2%的Leupeptin,余下部分为去离子水;

[0028] 以重量百分比计,终止缓冲液包括0.05-0.20%的氯化钠、0.002-0.02%的碳酸氢铵、0.2-1% Tritonx-100和0.02-0.2%蛋白酶K;余下部分为去离子水;

[0029] (2) 制备Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠

[0030] 1) 溶剂热法制备三氧化二铁纳米球,直径为50-100nm;

[0031] 2) 采用Stöber法,在三氧化二铁纳米球外包覆二氧化硅,得到Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球,具体步骤为:称取5重量份步骤1)制备得到的三氧化二铁纳米球,向其中依次加入25重量份去离子水、45重量份无水乙醇和10重量份质量分数为5-15%的氨水,超声混合均匀后向混合液中加入10重量份正硅酸乙酯,25℃下机械搅拌1小时;反应完毕后,将所得溶液离心,并依次用去离子水和乙醇清洗2-3次,将所得产物在50℃-75℃烘箱中干燥待用;

[0032] 3) 使用硅烷偶联剂氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷对步骤2)获得的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球进行硅烷化处理,得到Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS;硅烷化具体步骤为:以细胞样本为100重量份:称取5重量份步骤2)得到的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>纳米球,加入到25重量份二甲基甲酰胺中,超声分散后得到溶液A;将15重量份的氨乙基氨丙基聚二甲基硅氧烷和25重量份的二甲基甲酰胺混合均匀后,加入丁二酸酐使得混合溶液pH值维持在4-5,在50℃-75℃下机械搅拌3小时,得到溶液B;将溶液A、B混合后加入30重量份去离子水,在50℃-75℃下继续机械搅拌1小时后,将所得溶液离心,并依次用去离子水和乙醇清洗3次,制得硅烷化的Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠;

[0033] (4) 结合抗体

[0034] 对应每1g猪的肝组织,取1.5ug组蛋白修饰抗体,在4℃条件下孵育20小时,然后用30-50ul 10mM Tris-HCl溶液洗涤3次,以1000rpm转速离心5分钟,取上清,转至低吸附的离心管中,加入Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠,置于4℃条件下旋转,孵育3-5小时,保证Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠和组蛋白修饰抗体充分复合;

[0035] (5) 免疫共沉淀

[0036] 对应每1g猪的肝组织,在装有猪的肝组织裂解液EP管中加入25μl Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物,置于4℃条件下旋转,孵育3-5小时,让目标组蛋白与Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物结合;将猪的肝组织裂解液EP管放在磁力架上,吸去上清;

[0037] (6) 洗脱

[0038] 对应每1g猪的肝组织,在装有猪的肝组织裂解液EP管加入20 $\mu$ l的100mM氯化钠溶液,轻轻重悬Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物;40-50℃水浴加热10分钟;将EP管放在磁力架上,去除上清,用200 $\mu$ l4℃的0.5mMEDTA溶液洗涤1-2次,用200 $\mu$ l350mM氯化钠溶液洗涤2-3次,用200 $\mu$ l50mMTris-HCl溶液洗涤2-3次,以上洗涤每次10-15分钟;加50 $\mu$ l洗脱缓冲液在37℃洗脱30分钟,转上清至新的离心管中加2.5 $\mu$ g蛋白酶K,在50-75℃条件下解交联过夜;用150 $\mu$ l洗脱缓冲液在37℃洗脱Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@SiO<sub>2</sub>-APTS纳米磁珠-抗体复合物20-30分钟,溶出DNA;

[0039] 以重量百分比计,洗脱缓冲液包括5-15%的氯化镁、10-20%的氯化钠、20-25%的乙二醇、0.001-0.01%的硫氰酸钠和0.5-0.2%SDS;余下部分为去离子水。

专利名称(译)	应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN108181461A</a>	公开(公告)日	2018-06-19
申请号	CN2017111463595.4	申请日	2017-12-29
[标]发明人	李旦		
发明人	李旦		
IPC分类号	G01N33/539 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/587 G01N33/539		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及应用于组织样本中组蛋白修饰染色体免疫共沉淀优化方法，其特征在于，对组织样本依次进行破碎裂解、制备Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-APTS纳米磁珠、结合抗体、免疫共沉淀、洗脱处理，与现有技术相比，本发明能够在高通量水平上精准定位组蛋白的结合位点，提高临床样本的检测效果。