



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110988329 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911341361.1

(22)申请日 2019.12.23

(71)申请人 贞丰县人民医院

地址 562200 贵州省贞丰县珉谷镇南环路

(72)发明人 卢远英 吴垠

(74)专利代理机构 北京国坤专利代理事务所

(普通合伙) 11491

代理人 赵红霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/539(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

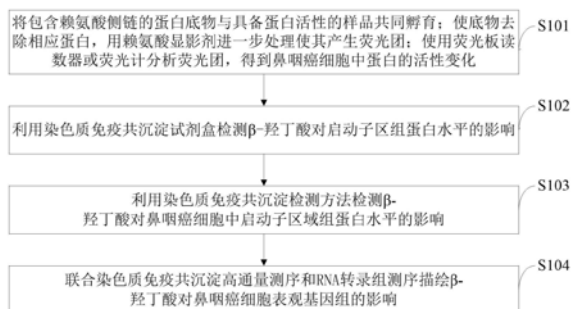
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途

(57)摘要

本发明属于医疗技术领域,公开了一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途,所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途为用于调控鼻咽癌基因的转录与表达。具体方法包括:分析确定 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中蛋白的活性影响;利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测 β -羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响;利用染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响;联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。本发明分析确定了 β -羟丁酸能够用于调控鼻咽癌基因的转录与表达,为探讨鼻咽癌的发生发展提供了新的思路。



1. 一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途为用于调控鼻咽癌基因的转录与表达。

2. 如权利要求1所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 所述 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达方法包括以下步骤:

步骤一, 将包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同孵育; 使底物去除相应蛋白, 用赖氨酸显影剂进一步处理使其产生荧光团; 使用荧光板读数器或荧光计分析荧光团, 得到鼻咽癌细胞中蛋白的活性变化;

步骤二, 利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测 β -羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响;

步骤三, 利用染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响;

步骤四, 联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。

3. 如权利要求2所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 步骤一中, 所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品利用孵育盒进行孵育; 所述孵育为旋转孵育, 所述旋转孵育的转速为20循环/分钟~30循环/分钟, 所述孵育在5℃~10℃过夜进行。

4. 如权利要求3所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 所述进行孵育的方法具体包括:

(1) 所述孵育盒接收孵育指令;

(2) 控制设置在试管孔板上方的上层加热板的温度为第一加热温度, 设置在所述试管孔板下方的下层加热板的温度为第二加热温度; 其中, 所述第一加热温度大于所述第二加热温度;

(3) 通过所述上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育。

5. 如权利要求4所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 步骤(3)中, 所述通过上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育之后, 还包括:

1) 当对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同加热时长达到所述第一预设时长时, 控制所述上层加热板的温度为第一退火温度, 所述下层加热板的温度为第二退火温度;

2) 通过上层加热板和下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理;

其中, 所述第一退火温度小于所述第一加热温度, 所述第二退火温度小于所述第二加热温度, 且所述第一退火温度大于所述第二退火温度。

6. 如权利要求5所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 步骤2)中, 所述通过上层加热板和所述下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理之后, 还包括:

向报警设备发送报警提示指令。

7. 如权利要求2所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 步骤三中,

所述染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响具体包括：

(I) 提取鼻咽癌细胞细胞核、蛋白质和DNA交联固定,形成交联的蛋白质染色质复合物;

(II) 加入蛋白酶抑制剂利用超声波粉碎技术进行细胞核膜的裂解,利用超声波剪切染色质;

(III) 加入缓冲液进行离心,弃上清,保留沉淀;

(IV) 纯化DNA,并进行目的基因的定量分析,蛋白结合DNA全基因组分析。

8. 如权利要求7所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途,其特征在于,步骤(I)中,所述采用甲醛进行所述交联固定,所述甲醛的终浓度为0.1% (v/v) ~ 5% (v/v),所述交联的时间为5分钟~20分钟。

9. 如权利要求7所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途,其特征在于,步骤(II)中,所述采用超声方法进行所述剪切,所述超声方法为:开启超声30秒~50秒和停止超声40秒~80秒为一个循环,进行5个~10个循环;所述超声的频率为30kHz~70kHz。

10. 如权利要求7所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途,其特征在于,步骤(III)中,所述离心速度为1500~2000r/min;离心时间为2分钟~4分钟。

一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途

技术领域

[0001] 本发明属于医疗技术领域,尤其涉及一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途。

背景技术

[0002] 目前,业内常用的现有技术是这样的:鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是发生于鼻咽黏膜的上皮性恶性肿瘤。鼻咽癌在大部分发达国家地区很罕见,发病率低于1/10万(人/年),而在我国华南地区及东南亚地区,其发病率高至10-25/10万(人/年)。鼻咽癌的发生是一个多步骤、多因素相互作用的过程,其病因主要包括遗传易感性、EB病毒(epstein-barrvirus,EBV)感染和环境致癌。目前鼻咽癌的主要治疗手段是以放射治疗为主的综合治疗。随着治疗手段的不断优化,鼻咽癌患者的总五年生存率已达到80%以上,但仍有部分患者出现肿瘤的局部复发和远处转移而治疗失败。

[0003] β -羟丁酸是酮体的主要组分,除供能外 β -羟丁酸还被报道作为信号分子参与基因表达调控。还有报道称 β -羟丁酸具有抗氧化应激、抗硝基化损伤作用,但内在分子机制尚不清楚。最近有研究表明, β -羟丁酸作为内源性HDAC抑制剂,可选择性升高抗氧化等保护性基因启动子部位的组蛋白乙酰化水平,起到保护作用。但是, β -羟丁酸能否调控鼻咽癌基因的转录与表达,还没有相关研究或报道。

[0004] 综上所述,现有技术存在的问题是:现有技术中并未相关 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达的相关报道。

发明内容

[0005] 针对现有技术存在的问题,本发明提供了一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途。

[0006] 本发明是这样实现的,一种 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途,所述 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途为用于调控鼻咽癌基因的转录与表达。

[0007] 进一步,所述 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达方法包括以下步骤:

[0008] 步骤一,将包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同孵育;使底物去除相应蛋白,用赖氨酸显影剂进一步处理使其产生荧光团;使用荧光板读数器或荧光计分析荧光团,得到鼻咽癌细胞中蛋白的活性变化。

[0009] 步骤二,利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测 β -羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响。

[0010] 步骤三,利用染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响。

[0011] 步骤四,联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。

[0012] 进一步,步骤一中,所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品利用

孵育盒进行孵育；所述孵育为旋转孵育，所述旋转孵育的转速为20循环/分钟～30循环/分钟，所述孵育在5℃～10℃过夜进行；。

[0013] 进一步，所述进行孵育的方法具体包括：

[0014] (1) 所述孵育盒接收孵育指令。

[0015] (2) 控制设置在试管孔板上方的上层加热板的温度为第一加热温度，设置在所述试管孔板下方的下层加热板的温度为第二加热温度；其中，所述第一加热温度大于所述第二加热温度。

[0016] (3) 通过所述上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育。

[0017] 进一步，步骤(3)中，所述通过所述上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育之后，还包括：

[0018] 1) 当对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同加热时长达到所述第一预设时长时，控制所述上层加热板的温度为第一退火温度，所述下层加热板的温度为第二退火温度。

[0019] 2) 通过所述上层加热板和所述下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理。

[0020] 其中，所述第一退火温度小于所述第一加热温度，所述第二退火温度小于所述第二加热温度，且所述第一退火温度大于所述第二退火温度。

[0021] 进一步，步骤2)中，所述通过所述上层加热板和所述下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理之后，还包括：向报警设备发送报警提示指令。

[0022] 进一步，步骤三中，所述染色质免疫共沉淀检测方法检测β-羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响具体包括：

[0023] (I) 提取鼻咽癌细胞细胞核、蛋白质和DNA交联固定，形成交联的蛋白质染色质复合物。

[0024] (II) 加入蛋白酶抑制剂利用超声波粉碎技术进行细胞核膜的裂解，利用超声波剪切染色质。

[0025] (III) 加入缓冲液进行离心，弃上清，保留沉淀。

[0026] (IV) 纯化DNA，并进行目的基因的定量分析，蛋白结合DNA全基因组分析。

[0027] 进一步，步骤(I)中，所述采用甲醛进行所述交联固定，所述甲醛的终浓度为0.1% (v/v)～5% (v/v)，所述交联的时间为5分钟～20分钟。

[0028] 进一步，步骤(II)中，所述采用超声方法进行所述剪切，所述超声方法为：开启超声30秒～50秒和停止超声40秒～80秒为一个循环，进行5个～10个循环；所述超声的频率为30kHz～70kHz。

[0029] 进一步，步骤(III)中，所述离心速度为1500～2000r/min；离心时间为2分钟～4分钟。

[0030] 综上所述，本发明的优点及积极效果为：本发明分析确定了β-羟丁酸能够用于调控鼻咽癌基因的转录与表达，为探讨鼻咽癌的发生发展提供了新的思路。本发明采用染色质免疫共沉淀检测方法检测β-羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响，获得

的DNA能很好的控制在100~500bp之间,浓度明显比同类产品良好,能够提高10% (m/v) 左右。因此,本发明设计巧妙,操作简便快捷,成本低,适于大规模推广应用;还有利于提高科研和临床样本的检测效果,有利于表观学研究和临床生物医药的开发和结果检测,适于大规模推广应用。

附图说明

[0031] 图1是本发明实施例提供的 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达方法流程图。

具体实施方式

[0032] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0033] 下面结合附图对本发明的技术方案与技术效果做详细说明。

[0034] 本发明实施例提供的 β -羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途为用于调控鼻咽癌基因的转录与表达。

[0035] 如图1所示,本发明实施例提供的 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达方法包括以下步骤:

[0036] S101:将包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同孵育;使底物去除相应蛋白,用赖氨酸显影剂进一步处理使其产生荧光团;使用荧光板读数器或荧光计分析荧光团,得到鼻咽癌细胞中蛋白的活性变化。

[0037] S102:利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测 β -羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响。

[0038] S103:利用染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响。

[0039] S104:联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。

[0040] 本发明提供的S101中,所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品利用孵育盒进行孵育;所述孵育为旋转孵育,所述旋转孵育的转速为20循环/分钟~30循环/分钟,所述孵育在5℃~10℃过夜进行;。

[0041] 本发明提供的进行孵育的方法具体包括:

[0042] (1) 所述孵育盒接收孵育指令。

[0043] (2) 控制设置在试管孔板上方的上层加热板的温度为第一加热温度,设置在所述试管孔板下方的下层加热板的温度为第二加热温度;其中,所述第一加热温度大于所述第二加热温度。

[0044] (3) 通过所述上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育。

[0045] 本发明提供的步骤(3)中,所述通过所述上层加热板和所述下层加热板对包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同进行加热孵育之后,还包括:

[0046] 1) 当对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同加热时长达

到所述第一预设时长时,控制所述上层加热板的温度为第一退火温度,所述下层加热板的温度为第二退火温度。

[0047] 2)通过所述上层加热板和所述下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理。

[0048] 其中,所述第一退火温度小于所述第一加热温度,所述第二退火温度小于所述第二加热温度,且所述第一退火温度大于所述第二退火温度。

[0049] 本发明提供的步骤2)中,所述通过所述上层加热板和所述下层加热板对所述包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品进行第二预设时长的退火处理之后,还包括:向报警设备发送报警提示指令。

[0050] 本发明提供的S103中,所述染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响具体包括:

[0051] (I)提取鼻咽癌细胞细胞核、蛋白质和DNA交联固定,形成交联的蛋白质染色质复合物。

[0052] (II)加入蛋白酶抑制剂利用超声波粉碎技术进行细胞核膜的裂解,利用超声波剪切染色质。

[0053] (III)加入缓冲液进行离心,弃上清,保留沉淀。

[0054] (IV)纯化DNA,并进行目的基因的定量分析,蛋白结合DNA全基因组分析。

[0055] 本发明提供的步骤(I)中,所述采用甲醛进行所述交联固定,所述甲醛的终浓度为0.1% (v/v)~5% (v/v),所述交联的时间为5分钟~20分钟。

[0056] 本发明提供的步骤(II)中,所述采用超声方法进行所述剪切,所述超声方法为:开启超声30秒~50秒和停止超声40秒~80秒为一个循环,进行5个~10个循环;所述超声的频率为30kHz~70kHz。

[0057] 本发明提供的步骤(III)中,所述离心速度为1500~2000r/min;离心时间为2分钟~4分钟。

[0058] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

[0059] 实施例1

[0060] 本发明实施例1提供的 β -羟丁酸调控鼻咽癌基因的转录与表达方法包括以下步骤:

[0061] (1)将包含赖氨酸侧链的蛋白底物与具备蛋白活性的样品共同孵育;使底物去除相应蛋白,用赖氨酸显影剂进一步处理使其产生荧光团;使用荧光板读数器或荧光计分析荧光团,得到鼻咽癌细胞中蛋白的活性变化。

[0062] (2)利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测 β -羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响;所述孵育为旋转孵育,所述旋转孵育的转速为20循环/分钟,所述孵育在5℃过夜进行。

[0063] (3)利用染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响。

[0064] (4)联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。

[0065] 实施例2

[0066] 本发明实施例2提供的染色质免疫共沉淀检测方法检测 β -羟丁酸对鼻咽癌细胞中

启动子区域组蛋白水平的影响具体包括：

[0067] (I) 提取鼻咽癌细胞细胞核、蛋白质和DNA交联固定，形成交联的蛋白质染色质复合物；采用甲醛进行所述交联固定，所述甲醛的终浓度为0.1% (v/v)，所述交联的时间为5分钟。

[0068] (II) 加入蛋白酶抑制剂利用超声波粉碎技术进行细胞核膜的裂解，利用超声波剪切染色质：开启超声30秒和停止超声40秒为一个循环，进行5个循环；所述超声的频率为30kHz。

[0069] (III) 加入缓冲液进行离心，弃上清，保留沉淀；离心速度为1500r/min；离心时间为2分钟。

[0070] (IV) 纯化DNA，并进行目的基因的定量分析，蛋白结合DNA全基因组分析。

[0071] 实施例3

[0072] 本发明实施例3提供的染色质免疫共沉淀检测方法检测β-羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响具体包括：

[0073] (I) 提取鼻咽癌细胞细胞核、蛋白质和DNA交联固定，形成交联的蛋白质染色质复合物；采用甲醛进行所述交联固定，所述甲醛的终浓度为3% (v/v)，所述交联的时间为15分钟。

[0074] (II) 加入蛋白酶抑制剂利用超声波粉碎技术进行细胞核膜的裂解，利用超声波剪切染色质：开启超声40秒和停止超声60秒为一个循环，进行8个循环；所述超声的频率为50kHz。

[0075] (III) 加入缓冲液进行离心，弃上清，保留沉淀；离心速度为1500r/min；离心时间为2分钟。

[0076] (IV) 纯化DNA，并进行目的基因的定量分析，蛋白结合DNA全基因组分析。

[0077] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

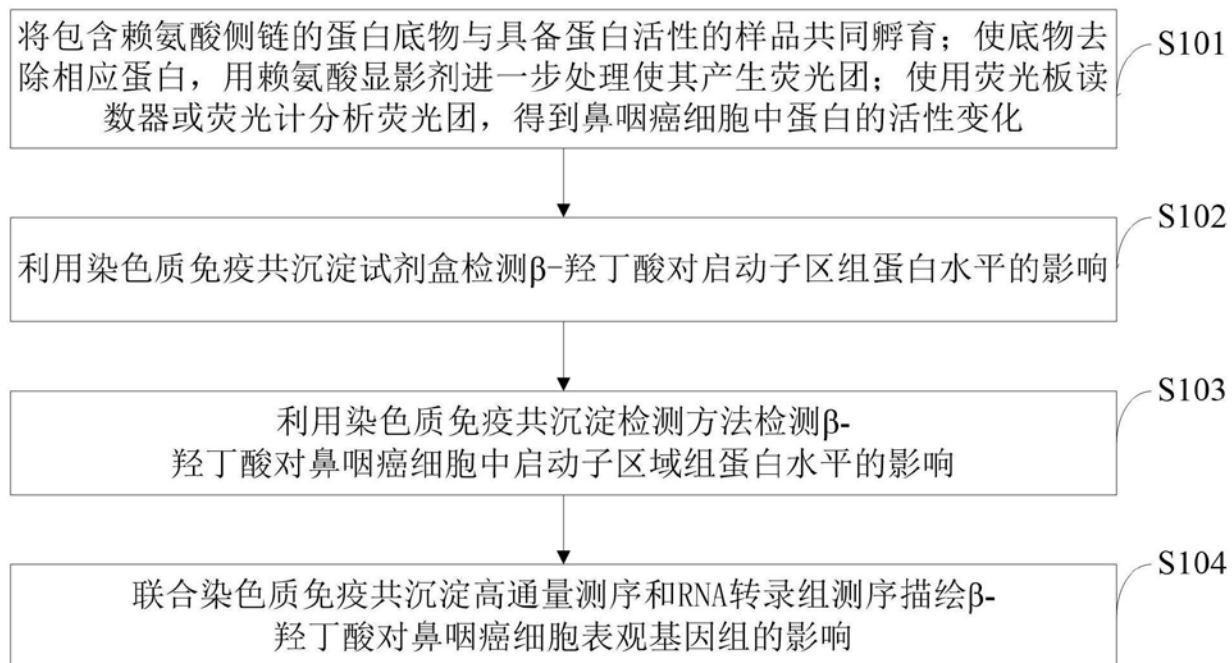


图1

专利名称(译)	一种β-羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途		
公开(公告)号	CN110988329A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911341361.1	申请日	2019-12-23
[标]发明人	吴垠		
发明人	卢远英 吴垠		
IPC分类号	G01N33/539 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/539 G01N33/57407		
代理人(译)	赵红霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于医疗技术领域，公开了一种β-羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途，所述β-羟丁酸或其药学上可接受的盐的用途为用于调控鼻咽癌基因的转录与表达。具体方法包括：分析确定β-羟丁酸对鼻咽癌细胞中蛋白的活性影响；利用染色质免疫共沉淀试剂盒检测β-羟丁酸对启动子区组蛋白水平的影响；利用染色质免疫共沉淀检测方法检测β-羟丁酸对鼻咽癌细胞中启动子区域组蛋白水平的影响；联合染色质免疫共沉淀高通量测序和RNA转录组测序描绘β-羟丁酸对鼻咽癌细胞表观基因组的影响。本发明分析确定了β-羟丁酸能够用于调控鼻咽癌基因的转录与表达，为探讨鼻咽癌的发生发展提供了新的思路。

