



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102928603 A

(43) 申请公布日 2013.02.13

(21) 申请号 201110225743.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.08.08

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

(71) 申请人 刘军

G01N 33/534 (2006.01)

地址 214213 江苏省无锡市宜兴经济开发区
锦程大道 11 号宜兴创业园 D10

申请人 顾烽
王平

(72) 发明人 顾烽 刘军 王平 顾大年
李则孝

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛 戴朝荣

权利要求书 2 页 说明书 4 页

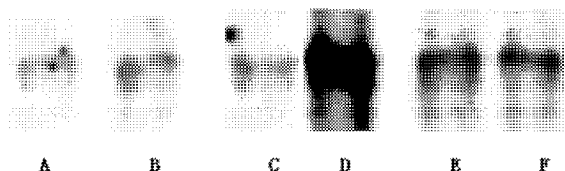
序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种通过检测转录因子激活蛋白-1 判断视网
膜细胞死亡进程的方法

(57) 摘要

本发明属于分子生物学分析、检测技术领域，
涉及一种通过检测转录因子激活蛋白-1 判断视网
膜细胞死亡进程的方法。首先从视网膜组织中
分离细胞核蛋白样品，用放射性同位素 ³²P 标记转
录因子激活蛋白-1 结合顺序寡核苷酸片段，并与
核蛋白提取物反应，然后通过电泳迁移率漂移试
验检测出转录因子激活蛋白-1 蛋白/DNA 复合物，
对其结果进行定量分析，最后将转录因子激活蛋
白-1 蛋白/DNA 复合物定量分析结果与免疫组织
化学检测到的细胞死亡过程相对照，从而确定视
网膜细胞的死亡进程。通过本发明方法判断遗传
性视网膜退化中视网膜细胞的死亡进程，为临床
诊断遗传性视网膜退化提供参考数据，具有特异
性强、灵敏度高、样品用量小、结果明确、重复性好
等优点。



1. 一种通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于首先从视网膜组织中分离细胞核蛋白样品,用放射性同位素 ^{32}P 标记转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段,并与核蛋白提取物反应,然后通过电泳迁移率漂移试验检测出转录因子激活蛋白 -1 蛋白 /DNA 复合物,对其结果进行定量分析,最后将转录因子激活蛋白 -1 蛋白 /DNA 复合物定量分析结果与免疫组织化学检测到的细胞死亡过程相对照,从而确定视网膜细胞的死亡进程。

2. 根据权利要求 1 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于该方法具体包含如下步骤:

1) 从视网膜组织中分离具有细胞核蛋白;

2) 放射性同位素 ^{32}P 标记转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段,标记后的寡核苷酸片段与核蛋白进行结合反应;

3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离结合反应物;

4) 抽干凝胶并曝光感光屏或 X 光胶片;

5) 转录因子转录因子激活蛋白 -1 蛋白与 ^{32}P 标记的转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段结合后,其复合物带有放射性,能曝光感光屏或 X 胶片而显现出清晰的条带,测定条带的位置和相对密度,即可获得有关转录因子转录因子激活蛋白 -1 水平的数据;

6) 将转录因子转录因子激活蛋白 -1 水平提升的速率和样式与免疫组织化学手段所显示的细胞死亡进程作比对,从而确定视网膜细胞的死亡进程。

3. 根据权利要求 2 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:步骤 1) 所述的从视网膜组织中分离具有细胞核蛋白的方法为:在匀浆缓冲系统中将组织匀浆,低速离心,取出沉淀物,充分悬浮于洗涤缓冲液中,再次离心,取出沉淀物,沉淀物充分悬浮于提取缓冲液中,充分提取;高速离心提取物,取上清液。

4. 根据权利要求 3 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:所述的匀浆缓冲系统配方为:蔗糖 0.25M, pH7.5-8.0 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸 15mM,氯化钾 60mM,氯化钠 15mM, pH 8.0 的乙二胺四乙酸 5mM, pH 8.0 的乙二醇二乙醚二胺四乙酸 1mM,精胺 0.15mM,精脘 0.15mM,二硫苏糖醇 1mM,苯甲基磺酰氟 0.5mM 蛋白酶抑制剂,25 微升/毫升;所述的洗涤缓冲液配方为 pH 7.3 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸或 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 10mM,氯化镁 1.5mM,氯化钾 10mM,二硫苏糖醇 1mM,蛋白酶抑制剂 25 微升/毫升;所述的提取缓冲液配方为 pH 7.3 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸;N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 10mM,氯化镁 0.75mM,氯化钾 0.5mM,二硫苏糖醇 1mM,磷酸钠 0.1mM,甘油 12.5%,蛋白酶抑制剂 25 微升/毫升。

5. 根据权利要求 2 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:步骤 2) 的具体方法是用含有放射性同位素 ^{32}P 的单核苷酸标记特定的转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段 SEQ ID No. 1,获得带有放射线标记的片段;混合标记片段、核蛋白样品和结合缓冲液,在室温下反应。

6. 根据权利要求 2 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:步骤 3) 所述的聚丙烯酰胺凝胶电泳采用中性的非变性凝胶电泳系统。

7. 根据权利要求 2 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:采用对放射性敏感的特殊感光屏。

8. 根据权利要求 2 所述的通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,其特征在于:步骤 5) 测定条带的位置和相对密度采用应用美国 GE 公司 ImageQuant workstation。

一种通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学分析、检测技术领域,涉及一种通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法。

背景技术

[0002] 遗传疾病长期以来一直在困扰着人类,遗传性视网膜退化是一个视网膜细胞迅速大量死亡的过程,迅速地导致失明。在世界范围已经开展和正在进行着大量的研究工作,但是对于这种疾病的分子生物学机制、尤其有关视网膜细胞迅速死亡的进程了解并不深刻;为了更深入地了解并进而防治这些疾病,大量先进的分子生物学技术正被用于临床前瞻性地诊断和治疗。转录因子转录因子激活蛋白 -1 在细胞增殖、凋亡过程中起着关键性的调控作用,其水平的变化直接而准确地反映了细胞异常死亡或无序增殖的过程。据研究表明,异常高水平的转录因子转录因子激活蛋白 -1 已在多种遗传病变组织中、多种肿瘤组织和细胞株中检测到;在国外诸多以阻断转录因子激活蛋白 -1 作用为目标的药物正处于研发中。转录因子转录因子激活蛋白 -1 将在遗传病和其他疾病、例如肿瘤等的研究中得到进一步的重视。

发明内容

[0003] 本发明的目的是针对现有技术的上述不足,提供一种通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法。

[0004] 本发明的目的可通过如下技术方案实现:

[0005] 一种通过检测转录因子激活蛋白 -1 判断视网膜细胞死亡进程的方法,首先从视网膜组织中分离细胞核蛋白样品,用放射性同位素 ^{32}P 标记转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段,并与核蛋白提取物反应,然后通过电泳迁移率漂移试验检测出转录因子激活蛋白 -1 蛋白 /DNA 复合物,对其结果进行定量分析,最后将转录因子激活蛋白 -1 蛋白 /DNA 复合物定量分析结果与免疫组织化学检测到的细胞死亡过程相对照,从而确定视网膜细胞的死亡进程。

[0006] 该方法具体包含如下步骤:

[0007] 1) 从视网膜组织中分离具有细胞核蛋白;

[0008] 2) 放射性同位素 ^{32}P 标记转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段,标记后的寡核苷酸片段与核蛋白进行结合反应;

[0009] 3) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离结合反应物;

[0010] 4) 抽干凝胶并曝光感光屏或 X 光胶片;

[0011] 5) 转录因子转录因子激活蛋白 -1 蛋白与 ^{32}P 标记的转录因子激活蛋白 -1 结合顺序寡核苷酸片段结合后,其复合物带有放射性,能曝光感光屏或 X 胶片而显现出清晰的条带,测定条带的位置和相对密度,即可获得有关转录因子转录因子激活蛋白 -1 水平的数

据；

[0012] 6) 将转录因子转录因子激活蛋白-1 水平提升的速率和样式与免疫组织化学手段所显示的细胞死亡进程作比对,从而确定视网膜细胞的死亡进程。

[0013] 步骤 1) 所述的从视网膜组织中分离具有细胞核蛋白的方法为:在匀浆缓冲系统中将组织匀浆,低速离心,取出沉淀物,充分悬浮于洗涤缓冲液中,再次离心,取出沉淀物,沉淀物充分悬浮于提取缓冲液中,充分提取;高速离心提取物,取上清液。

[0014] 其中,所述的匀浆缓冲系统配方为:蔗糖 0.25M, pH7.5-8.0 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸 15mM,氯化钾 60mM,氯化钠 15mM, pH 8.0 的乙二胺四乙酸 5mM, pH 8.0 的乙二醇二乙醚二胺四乙酸 1mM,精胺 0.15mM,精脘 0.15mM,二硫苏糖醇 1mM,苯甲基磺酰氟 0.5mM 蛋白酶抑制剂,25 微升/毫升;所述的洗涤缓冲液配方为 pH 7.3 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸或 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 10mM,氯化镁 1.5mM,氯化钾 10mM,二硫苏糖醇 1mM,蛋白酶抑制剂 25 微升/毫升;所述的提取缓冲液配方为 pH 7.3 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸;N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸 10mM,氯化镁 0.75mM,氯化钾 0.5mM,二硫苏糖醇 1mM,磷酸钠 0.1mM,甘油 12.5%,蛋白酶抑制剂 25 微升/毫升。

[0015] 步骤 2) 的具体方法是用含有放射性同位素 ³²P 的单核苷酸标记特定的转录因子激活蛋白-1 结合顺序寡核苷酸片段 SEQ ID No. 1,获得带有放射线标记的片段;混合标记片段、核蛋白样品和结合缓冲液,在室温下反应。

[0016] 步骤 3) 所述的聚丙烯酰胺凝胶电泳优选采用中性的非变性凝胶电泳系统。

[0017] 所述的感光屏优选采用对放射性敏感的特殊感光屏。

[0018] 步骤 5) 测定条带的位置和相对密度优选采用应用美国 GE 公司 ImageQuant workstation。

[0019] 有益效果:

[0020] 本发明建立在首次发现转录因子激活蛋白-1 (Activator Protein-1, AP-1) 在遗传性视网膜退化过程中的异常活化与视网膜细胞死亡进程的相关性的基础上。这个发现为阐明遗传性视网膜退化的分子生物学机制提供了极其重要的信息。通过本发明方法判断视网膜细胞的死亡进程,特别是遗传性视网膜退化中视网膜细胞的死亡进程,为临床诊断遗传性视网膜退化提供参考数据,具有特异性强、灵敏度高、样品用量小、结果明确、重复性好等优点。

附图说明

[0021] 图 1 检测转录因子 AP-1 水平的 EMSA 结果,显示在遗传病病变组织(视网膜)细胞死亡过程中不同时间的转录因子 AP-1 的水平。

[0022] A 采自正常动物的对照样品(受保护的右眼);

[0023] B 采自正常动物的试验样品(受光照的左眼);

[0024] C 光照后 1 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0025] D 光照后 1 小时后采自试验动物受光照的左眼;

[0026] E 光照后 4 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0027] F 光照后 4 小时后采自试验动物受光照的左眼;

[0028] G 光照后 24 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0029] H 光照后 24 小时后采自试验动物受光照的左眼。

[0030] 光照后 1 小时从单个实验动物采集 A、B 样品,光照后 4 小时采集 C、D 样品,24 小时后采集 E、F。结果显示,光照 1 小时后转录因子 AP-1 水平在 A 和 B 中无明显差别,细胞死亡过程尚未开始。样品 D 中 AP-1 水平较样品 C 增高数倍,此时细胞以最高速率大量死亡。AP-1 在样品 E、F 中又回复至相同水平,因为细胞死亡的过程已经结束。

[0031] 图 2 显示数字化的转录因子 AP-1 水平的差异,白色区域标记对照组织样品中转录因子 AP-1 水平,黑色为试验样品中转录因子 AP-1 水平。这是对图 1 的结果的数字化的描述。

[0032] A 采自正常动物的对照样品(受保护的右眼);

[0033] B 采自正常动物的试验样品(受光照的左眼);

[0034] C 光照后 1 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0035] D 光照后 1 小时后采自试验动物受光照的左眼;

[0036] E 光照后 4 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0037] F 光照后 4 小时后采自试验动物受光照的左眼;

[0038] G 光照后 24 小时后采自试验动物受保护的右眼;

[0039] H 光照后 24 小时后采自试验动物受光照的左眼。

具体实施方式

[0040] 实验背景说明(图 1、图 2):实验中使用了带有遗传缺陷的动物(犬类),在视紫色素基因(Opsin)第四密码子上发生突变(ACG → AGG),引起了视紫色素蛋白第四个氨基酸的改变(由苏氨酸变成精氨酸, Threonine → Arginine)。这一改变导致视紫色素蛋白结构和功能的异常。很微弱的光照就会使得这些动物的视网膜退化,大量的视网膜细胞会迅速死亡。在实验动物的左眼受到微弱的光照,而右眼则被遮挡,予以保护的情况下,免疫组织化学检测表明:左眼视网膜细胞在 1 小时后开始死亡,3-5 小时期间大量细胞迅速死亡(70%细胞在此时间段内死亡),12 小时细胞死亡过程基本停止,因为 95%以上视网膜细胞已经死亡。受保护的右眼中没有发生视网膜细胞死亡。

[0041] 实施例 1

[0042] 1) 提取有相当纯度和数量的核蛋白样品是本方法的基础。在 200 毫克组织样品中加入 1.5 毫升缓冲液,以最高速度匀浆 40 秒;整个匀浆过程在冰浴中进行,每匀浆 10 秒,须停机冷却 10 秒。

[0043] 2) 匀浆后低速离心(2000g, 10 分钟, 4℃)收集沉淀物,将其充分悬浮于 1 毫升洗涤液中,室温下轻微震荡 1 分钟。

[0044] 3) 再次离心(4000g, 10 分钟, 4℃),收集沉淀物并将其充分悬浮于 200 微升提取缓冲液中;室温下轻微摇动震荡过夜。

[0045] 4) 高速离心(15,000g, 30 分钟, 4℃),收集上清液;在沉淀物中加入 100 微升提取缓冲液,充分悬浮后,室温下轻微摇动震荡 60 分钟,取出上清液,与以上上清液合并;分装,低温储存(-80℃)。

[0046] 5) 用含 ³²P 的单核苷酸(³²P-ATP)在 T4 多聚核苷酸激酶系统中标记特定的 AP-1 结合顺序(5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3', SEQ ID No. 1)寡核苷酸片段(购自 PROMEGA

公司)。

[0047] 6) 混合 ^{32}P 标记寡核苷酸片段和组织核蛋白样品于 EMSA 缓冲系统 (购自 PROMEGA) 中, 室温下静置 30 分钟。

[0048] 7) 用中性 TBS 缓冲系统配制 6% 聚丙烯酰胺凝胶; 在每个结合反应样品中加入凝胶样品缓冲液, 充分混合后加至凝胶中, 进行电泳分离。

[0049] 8) 真空凝胶干燥器将电泳凝胶抽干, 曝光 X 光胶片或感光屏 (phosphorescence imager screen, GE Healthcare), 显示放射性标记的带有 AP-1 结合顺序寡核苷酸的片段与 AP-1 蛋白复合物位置, 测定其相对密度; 即可比较 AP-1 水平。

[0050] 9) 在测得了 AP-1 水平后, 明确地显示了其与组织细胞死亡过程 (速率、数量等等) 的密切的相关性。

[0051] 其中, 匀浆缓冲系统配方为: 蔗糖 0.25M, pH7.5-8.0 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸 15mM, 氯化钾 60mM, 氯化钠 15mM, pH 8.0 的乙二胺四乙酸 5mM, pH 8.0 的乙二醇二乙醚二胺四乙酸 1mM, 精胺 0.15mM, 精脘 0.15mM, 二硫苏糖醇 1mM, 苯甲基磺酰氟 0.5mM 蛋白酶抑制剂, 25 微升 / 毫升。

[0052] 洗涤缓冲液配方为 pH 7.3 的 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸或 N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N'-2- 乙烷磺酸 10mM, 氯化镁 1.5mM, 氯化钾 10mM, 二硫苏糖醇 1mM, 蛋白酶抑制剂 25 微升 / 毫升。

[0053] 提取缓冲液配方为 pH 7.3 的 4- 羟乙基哌嗪乙磺酸; N-(2- 羟乙基) 哌嗪 -N'-2- 乙烷磺酸 10mM, 氯化镁 0.75mM, 氯化钾 0.5mM, 二硫苏糖醇 1mM, 磷酸钠 0.1mM, 甘油 12.5%, 蛋白酶抑制剂 25 微升 / 毫升。

[0054] 上述蛋白酶抑制剂均为 MERCK 公司产品 -Protease Inhibitor Cocktail Set III。

[0001]

序列表

<110> 刘军, 顾烽, 王平

<120> 一种通过检测转录因子激活蛋白-1 判断视网膜细胞死亡进程的方法

<160> 1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 转录因子激活蛋白-1 结合顺序

<400> 1

cgcttgatga gtcagccgga a

21

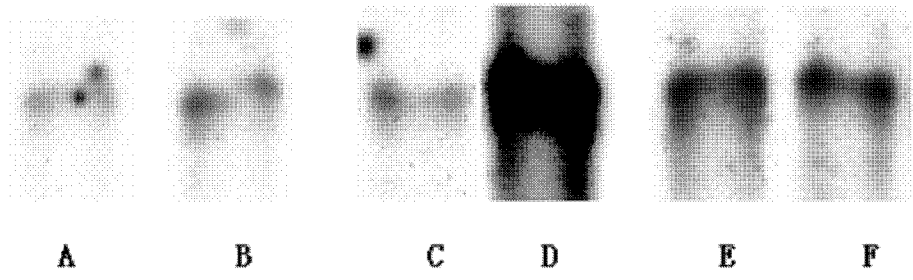


图 1

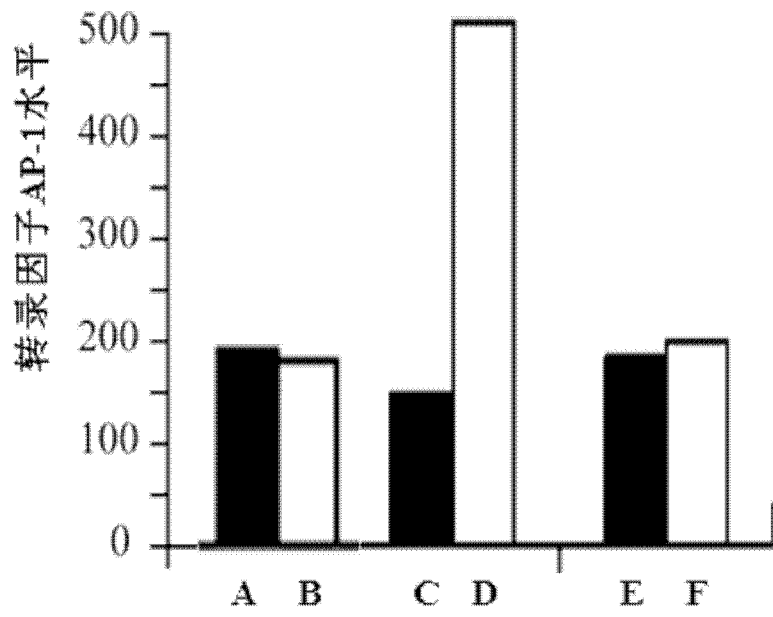


图 2

专利名称(译)	一种通过检测转录因子激活蛋白-1判断视网膜细胞死亡进程的方法		
公开(公告)号	CN102928603A	公开(公告)日	2013-02-13
申请号	CN201110225743.5	申请日	2011-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	刘军 顾烽 王平		
申请(专利权)人(译)	刘军 顾烽 王平		
当前申请(专利权)人(译)	刘军 顾烽 王平		
[标]发明人	顾烽 刘军 王平 顾大年 李则孝		
发明人	顾烽 刘军 王平 顾大年 李则孝		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/561 G01N33/534		
代理人(译)	戴朝荣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于分子生物学分析、检测技术领域，涉及一种通过检测转录因子激活蛋白-1判断视网膜细胞死亡进程的方法。首先从视网膜组织中分离细胞核蛋白样品，用放射性同位素³²P标记转录因子激活蛋白-1结合顺序寡核苷酸片段，并与核蛋白提取物反应，然后通过电泳迁移率漂移试验检测出转录因子激活蛋白-1蛋白/DNA复合物，对其结果进行定量分析，最后将转录因子激活蛋白-1蛋白/DNA复合物定量分析结果与免疫组织化学检测到的细胞死亡过程相对照，从而确定视网膜细胞的死亡进程。通过本发明方法判断遗传性视网膜退化中视网膜细胞的死亡进程，为临床诊断遗传性视网膜退化提供参考数据，具有特异性强、灵敏度高、样品用量小、结果明确、重复性好等优点。

