



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110531084 A

(43)申请公布日 2019.12.03

(21)申请号 201910746765.2

(22)申请日 2019.08.07

(71)申请人 暨南大学

地址 510000 广东省广州市黄埔大道西601号

(72)发明人 陈利国 陈伟豪 刘天浩 方梅霞 肖雅 周永红 何玲 袁静 许清芸 陈旭东 陶文聪

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

A61B 5/022(2006.01)

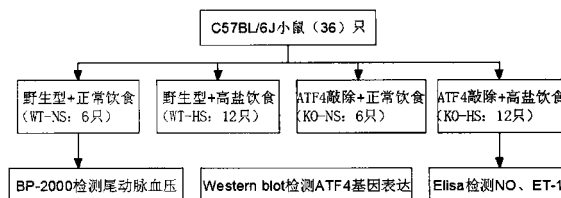
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4

(57)摘要

本发明公开了一种能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4,涉及医药技术领域,该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4中ATF4在高盐诱导小鼠高血压中的作用,发现敲除或敲低ATF4可阻滞高盐诱导小鼠的血压升高。敲除或敲低ATF4基因对血管具有保护作用。



1. 一种能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4, 其特征在于: 所述能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4包括实验动物: ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J小鼠购于南京动物模式研究所, 野生型C57BL/6J小鼠购于南方医科大学动物中心, 饲养于暨南大学实验动物管理中心SPF级屏障环境; 动物分组: ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J品系小鼠18只, 野生型小鼠18只, 分为基因敲除+正常饮食组(KO-NS: 6只)、基因敲除+8%高盐饮食组(KO-HS: 12只)、野生型+正常饮食组(WT-NS: 6只)、野生型+8%高盐饮食组(WT-HS: 12只); 造模方法: WT-NS组及KO-NS组给予正常小鼠饲料喂养, WT-HS组及KO-HS组给予南通特洛菲公司定制的8%高盐饲料喂养, 期间自由饮食、自由饮水, 共喂养28天; 第29天取小鼠胸主动脉做Western blot检测ATF4基因的表达。

2. 根据权利要求1所述的能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4, 其特征在于: 所述能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的操作步骤:

一、血压检测

开始正式实验前训练小鼠3天, 每天下午3点测量小鼠的血压; 当测量结果重复性很好, 并且测量集合的收缩压标准偏差很小时, 开始正式实验, 在正式测量血压时, 提前调节小鼠平台温度为37摄氏度, 进行压力校准和压力校准验证, 并检查尾套压力泄漏(测量期间每周进行一次压力校准和压力校准验证), 待小鼠平台温度稳定为37摄氏度时, 动作轻柔的将小鼠放在平台上热身静置5分钟左右, 使小鼠适应测量环境, 测量时保持测量房间安静, 减少小鼠测试前的焦虑不安, 之后将小鼠放置于小鼠固定器内, 将小鼠尾巴通过尾套, 穿过V型槽底部的传感器之上, 并且用医用胶布将小鼠的尾巴固定在平台上, 测量时橡胶套应套在鼠尾根部(距离鼠尾根部0.5CM左右), 橡胶套应下压固定; 每次测量橡胶套位置都应相同, 打开Blood Pressure Analysis程序开始测量, 测量结束后将小鼠从动物平台上取走, 小鼠在测试平台上不超过30分钟, 在正式实验前测量一次每组的血压值, 并在正式实验后每隔4天测量一次血压, 共测量7次, 整个周期为28天; 正式实验期间小鼠每天下午3点放置于在固定器10分钟, 且每步操作均由同一操作者完成;

二、总蛋白抽提

1、按1ml裂解液加10 μ l PMSF (100mM) 和10 μ l Cocktail, 摇匀置于冰上 (PMSF要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合);

2、组织需加液氮研磨, 添加600 μ l 含PMSF的裂解液 (100mg组织), 于冰上裂解30min, 为使细胞充分裂解要经常来回摇动;

3、裂解完后于4 $^{\circ}$ C下14000rpm离心5min。(提前开离心机预冷);

4、将离心后的上清分装转移倒干净的离心管中放于-80 $^{\circ}$ C保存;

5、将提取好样品的蛋白溶液和5 \times 上样缓冲液按4:1混合, 煮沸10min, 缓慢恢复室温后, 稍离心, 放于-20 $^{\circ}$ C保存;

三、SDS-PAGE电泳

1、凝胶电泳前, 每孔均用1 \times 电泳缓冲液清洗, 上、下层电泳槽中加入1 \times 电泳缓冲液, 上层槽中缓冲液液面需超过上样孔顶端;

2、根据样品的上样顺序和上样体积依次上样;

3、电泳: 80V恒压电泳至溴酚蓝至分离胶后, 120V恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止;

四、蛋白质转移

- 1、PVDF膜甲醇预处理3~5秒,放至转膜缓冲液浸润半小时;
 - 2、取出凝胶,将其放至滤纸上,形成凝胶转印堆积层,滤纸,凝胶,PVDF膜,滤纸,凝胶转印堆积层这样的“三明治”结构。此操作必须将气泡完全去除;
 - 3、按正负极方向放置转印夹;
 - 4、低温条件下,100V恒压116分钟;
- 五、免疫印记
- 1.取出杂交膜,TBST漂洗5min,1次;
 - 2.5%脱脂奶粉溶液室温封闭1小时;
 - 3.TBST洗膜10min,1次;
 - 4.合适的一抗稀释浓度4℃过夜;
 - 5.TBST洗膜10min,4次;
 - 6.相应二抗稀释液37℃孵育1h;
 - 7.TBST洗膜10min,4次;
 - 8.将杂交膜置于一透明塑料板上,注意不要让膜干燥;
 - 9.用一干净移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续5min;
 - 10.用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒;
 - 11.显影。

能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4

技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,特别涉及一种能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4。

背景技术

[0002] 高血压病是一种以动脉压升高为特征,可伴有心、脑、肾和血管等靶器官损害的全身性疾病。控制高血压病的发生发展已成为亟待解决的重要课题。血管内皮细胞具有高度发达的内质网,是细胞内膜型/分泌型蛋白合成的细胞器,在调节蛋白质正确折叠、钙稳态和细胞凋亡等方面具有重要作用,是维持血管内皮功能的重要亚细胞器。当多种刺激因素诱导内质网内未折叠蛋白质的聚集,导致钙离子及氧化还原反应的失衡,破坏内质网稳态,将会激活相应的信号通路,引发一系列反应,称为内质网应激。

[0003] 适度的ERS可通过迅速调节细胞内Ca²⁺平衡、蛋白质折叠修饰和细胞凋亡,从而维持内环境的稳态,使细胞不断适应环境的改变而发挥保护作用,但持续、过度的内质网应激会引起疾病的发生。已证实由ERS引发的血管内皮细胞障碍参与了各种由血管损伤引起的病理生理过程及相关疾病,如高血压、动脉粥样硬化、脑卒中等。近期研究表明,敲除人血管内皮细胞内质网应激标志蛋白ATF4可降低血管收缩因子ET-1 mRNA和蛋白表达水平,证实ATF4是ET-1的激活剂。以上研究结果提示,内质网应激的过度激活可能在高血压病血管内皮细胞功能障碍中起到重要作用。目前尚未有研究表明ATF4可参与高血压的形成。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4,可阻滞高盐诱导的小鼠血压升高。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供以下的技术方案:

[0006] 该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4包括实验动物:ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J小鼠购于南京动物模式研究所,野生型C57BL/6J小鼠购于南方医科大学动物中心,饲养于暨南大学实验动物管理中心SPF级屏障环境;动物分组:ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J品系小鼠18只,野生型小鼠18只,分为基因敲除+正常饮食组(KO-NS:6只)、基因敲除+8%高盐饮食组(KO-HS:12只)、野生型+正常饮食组(WT-NS:6只)、野生型+8%高盐饮食组(WT-HS:12只);造模方法:WT-NS组及KO-NS组给予正常小鼠饲料喂养,WT-HS组及KO-HS组给予南通特洛菲公司定制的8%高盐饲料喂养,期间自由饮食、自由饮水,共喂养28天;第29天取小鼠胸主动脉做Western blot检测ATF4基因的表达。

[0007] 1.该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的操作步骤:

[0008] 一、血压检测

[0009] 开始正式实验前训练小鼠3天,每天下午3点测量小鼠的血压;当测量结果重复性很好,并且测量集合的收缩压标准偏差很小时,开始正式实验,在正式测量血压时,提前调节小鼠平台温度为37摄氏度,进行压力校准和压力校准验证,并检查尾套压力泄漏(测量期

间每周进行一次压力校准和压力校准验证),待小鼠平台温度稳定为37摄氏度时,动作轻柔的将小鼠放在平台上热身静置5分钟左右,使小鼠适应测量环境,测量时保持测量房间安静,减少小鼠测试前的焦虑不安,之后将小鼠放置于小鼠固定器内,将小鼠尾巴通过尾套,穿过V型槽底部的传感器之上,并且用医用胶布将小鼠的尾巴固定在平台上,测量时橡胶套应套在鼠尾根部(距离鼠尾根部0.5CM左右),橡胶套应下压固定;每次测量橡胶套位置都应相同,打开Blood Pressure Analysis程序开始测量,测量结束后将小鼠从动物平台上取走,小鼠在测试平台上不超过30分钟,在正式实验前测量一次每组的血压值,并在正式实验后每隔4天测量一次血压,共测量7次,整个周期为28天;正式实验期间小鼠每天下午3点放置于在固定器10分钟,且每步操作均由同一操作者完成;

[0010] 二、总蛋白抽提

[0011] 1、按1ml裂解液加10 μ l PMSF(100mM)和10 μ l Cocktail,摇匀置于冰上(PMSF要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合);

[0012] 2、组织需加液氮研磨,添加600 μ l含PMSF的裂解液(100mg组织),于冰上裂解30min,为使细胞充分裂解要经常来回摇动;

[0013] 3、裂解完后于4 $^{\circ}$ C下14000rpm离心5min。(提前开离心机预冷);

[0014] 4、将离心后的上清分装转移倒干净的离心管中放于-80 $^{\circ}$ C保存;

[0015] 5、将提取好样品的蛋白溶液和5 \times 上样缓冲液按4:1混合,煮沸10min,缓慢恢复室温后,稍离心,放于-20 $^{\circ}$ C保存;

[0016] 三、SDS-PAGE电泳

[0017] 1、凝胶电泳前,每孔均用1 \times 电泳缓冲液清洗,上、下层电泳槽中加入1 \times 电泳缓冲液,上层槽中缓冲液液面需超过上样孔顶端;

[0018] 2、根据样品的上样顺序和上样体积依次上样;

[0019] 3、电泳:80V恒压电泳至溴酚蓝至分离胶后,120V恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止;

[0020] 四、蛋白质转移

[0021] 1、PVDF膜甲醇预处理3~5秒,放至转膜缓冲液浸润半小时;

[0022] 2、取出凝胶,将其放至滤纸上,形成凝胶转印堆积层,滤纸,凝胶,PVDF膜,滤纸,凝胶转印堆积层这样的“三明治”结构。此操作必须将气泡完全去除;

[0023] 3、按正负极方向放置转印夹;

[0024] 4、低温条件下,100V恒压116分钟;

[0025] 五、免疫印记

[0026] 1.取出杂交膜,TBST漂洗5min,1次;

[0027] 2.5%脱脂奶粉溶液室温封闭1小时;

[0028] 3.TBST洗膜10min,1次;

[0029] 4.合适的一抗稀释浓度4 $^{\circ}$ C过夜;

[0030] 5.TBST洗膜10min,4次;

[0031] 6.相应二抗稀释液37 $^{\circ}$ C孵育1h;

[0032] 7.TBST洗膜10min,4次;

[0033] 8.将杂交膜置于一透明塑料板上,注意不要让膜干燥;

- [0034] 9.用一干净移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面,并使反应持续5min;
- [0035] 10.用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液,放至暗盒;
- [0036] 11.显影。
- [0037] 采用以上技术方案的有益效果是:该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4中ATF4在高盐诱导小鼠高血压中的作用,发现敲除或敲低ATF4可阻滞高盐诱导小鼠的血压升高。敲除或敲低ATF4基因对血管具有保护作用。

附图说明

- [0038] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细的描述。
- [0039] 图1是该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的技术路线图;
- [0040] 图2是该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的血压收缩展示图;
- [0041] 图3是ATF4蛋白相对表达量;
- [0042] 图4是ELISA统计结果图。

具体实施方式

- [0043] 下面结合附图详细说明本发明能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的优选实施方式。
- [0044] 图1、图2、图3和图4出示本发明能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的具体实施方式:
- [0045] 结合图1、图2、图3和图4,实验动物:ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J小鼠购于南京动物模式研究所,野生型C57BL/6J小鼠购于南方医科大学动物中心,饲养于暨南大学实验动物管理中心SPF级屏障环境。
- [0046] 动物分组:ATF4基因敲除或敲低C57BL/6J品系小鼠18只,野生型小鼠18只。分为基因敲除+正常饮食组(KO-NS:6只)、基因敲除+8%高盐饮食组(KO-HS:12只)、野生型+正常饮食组(WT-NS:6只)、野生型+8%高盐饮食组(WT-HS:12只)。
- [0047] 造模方法:WT-NS组及KO-NS组给予正常小鼠饲料喂养,WT-HS组及KO-HS组给予南通特洛菲公司定制的8%高盐饲料喂养,期间自由饮食、自由饮水,共喂养28天;第29天取小鼠胸主动脉做Western blot检测ATF4基因的表达。
- [0048] 抗体:ATF4 Antibody(11815S)、GAPDH Loading Control antibody(51332S)、Goat Anti-Mouse IgG antibody(14709S)均购于美国CST公司。
- [0049] 实验仪器及耗材:BP-2000 SERIES II Blood Pressure Analysis System购于Visitech Systems公司,酶标仪(3530910449)购于赛默飞世尔(上海)仪器有限公司,垂直电泳槽(VE180)及转移电泳槽(VE186)购于上海天能科技有限公司,电泳仪(BG-Power 600i)购于北京百晶生物技术有限公司,摇床(TS-1)购于金坛市富华仪器有限公司,高速离心机(TGL-16R)购于珠江黑马,超声仪细胞破碎仪(JY92-IIN)购于宁波新芝生物科技股份有限公司,暗匣及暗室灯(AX-II)购于广东粤华医疗器械厂有限公司。
- [0050] 其他材料和化学试剂:小鼠饲料购于南通特洛菲饲料科技有限公司,医用X射线胶片(XBT-1)购于柯达公司,发光液IMMOBILON WESTERN CHEMILUM HRP SUBSTRATE

(WBKLS0500) 购于MILLIPORE公司, PVDF膜Immobilon-P Transfer Membrane (IPVH00010) 购于MILLIPORE公司, Cocktail (P8340) 购于Sigma, 磷酸酶抑制剂 (KGP602) 及BCA法蛋白含量检测试剂盒 (KGPBCA) 购于南京凯基生物发展有限公司, PageRuler Prestained Protein Ladder (26617) 及蛋白预染Marker (SM0672) 购于Thermo公司, RIPA裂解液及一抗稀释液 (P0013) 购于上海碧云天生物技术有限公司, Tris Base、甘氨酸、脱脂奶粉购于威佳科技有限公司, SDS、甘油、Beta-巯基乙醇、过硫酸铵购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司, BPB购于博大泰克, 丙烯酰胺30% (Lot1108) 购于申能博彩生物科技公司, 乙醇、甲醇、无水亚硫酸钠、硫代硫酸钠、冰醋酸购于广州牌化学试剂, Tween-20购于生工生物工程(上海)有限公司, 显影粉购于天津市世纪奥博商贸有限公司。

[0051] 技术路线图如图1所示。

[0052] 该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4的操作步骤:

[0053] 一、血压检测

[0054] 开始正式实验前训练小鼠3天, 每天下午3点测量小鼠的血压; 当测量结果重复性很好, 并且测量集合的收缩压标准偏差很小时, 开始正式实验。在正式测量血压时, 提前调节小鼠平台温度为37摄氏度, 进行压力校准和压力校准验证, 并检查尾套压力泄漏(测量期间每周进行一次压力校准和压力校准验证)。待小鼠平台温度稳定为37摄氏度时, 动作轻柔的将小鼠放在平台上热身静置5分钟左右, 使小鼠适应测量环境, 测量时保持测量房间安静, 减少小鼠测试前的焦虑不安。之后将小鼠放置于小鼠固定器内, 将小鼠尾巴通过尾套, 穿过V型槽底部的传感器之上, 并且用医用胶布将小鼠的尾巴固定在平台上。测量时橡胶套应套在鼠尾根部(距离鼠尾根部0.5CM左右), 橡胶套应下压固定; 每次测量橡胶套位置都应相同, 打开Blood Pressure Analysis程序开始测量。测量结束后将小鼠从动物平台上取走, 小鼠在测试平台上不超过30分钟。在正式实验前测量一次每组的血压值, 并在正式实验后每隔4天测量一次血压, 共测量7次, 整个周期为28天; 正式实验期间小鼠每天下午3点放置于在固定器10分钟, 且每步操作均由同一操作者完成。

[0055] 二、总蛋白抽提

[0056] 1、按1ml裂解液加10 μ l PMSF (100mM) 和10 μ l Cocktail, 摇匀置于冰上 (PMSF要摇匀至无结晶时才可与裂解液混合)。

[0057] 2、组织需加液氮研磨, 添加600 μ l 含PMSF的裂解液 (100mg组织), 于冰上裂解30min, 为使细胞充分裂解要经常来回摇动。

[0058] 3、裂解完后于4 $^{\circ}$ C下14000rpm离心5min。(提前开离心机预冷)。

[0059] 4、将离心后的上清分装转移倒干净的离心管中放于-80 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 5、将提取好样品的蛋白溶液和5 \times 上样缓冲液按4:1混合, 煮沸10min, 缓慢恢复室温后, 稍离心, 放于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0061] 二、蛋白样品初步定量

[0062] 以下操作步骤参照南京凯基生物发展有限公司提供的试剂盒说明书整理, 货号为: KGPBCA

[0063] 1、按下表稀释标准样品制作标准曲线:

[0064]

Vial	Volume of Diluent	Volume and source of BSA	Final BSA Concentration
A	70 μ L H ₂ O	10 μ L BSA	250 μ g/ml

B	40 μ L H2O	40 μ L A	125 μ g/ml
C	45 μ L H2O	30 μ L B	50 μ g/ml
D	40 μ L H2O	40 μ L C	25 μ g/ml
E	40 μ L H2O	10 μ L D	5 μ g/ml
F	40 μ L H2O	0	0 μ g/ml

- [0065] 2、稀释实验样品：每个样品取2 μ L，加38 μ L H2O稀释20倍。按顺序排列好。
- [0066] 3、配制BCA试剂浓度测定工作液：取50体积A液，加入1体积B液，充分混匀，现配现用。
- [0067] 4、准备96孔板，各取20 μ L稀释好的标准样品和实验样品于96孔板中。每孔加入200 μ L工作液，37 $^{\circ}$ C避光孵育30min。
- [0068] 5、于酶标仪中读取吸光值即OD值，波长为560nm。
- [0069] 三、SDS-PAGE电泳
- [0070] 1、凝胶电泳前，每孔均用1 \times 电泳缓冲液清洗。上、下层电泳槽中加入1 \times 电泳缓冲液，上层槽中缓冲液液面需超过上样孔顶端。
- [0071] 2、根据样品的上样顺序和上样体积依次上样。
- [0072] 3、电泳：80V恒压电泳至溴酚蓝至分离胶后，120V恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。
- [0073] 四、蛋白质转移
- [0074] 1、PVDF膜甲醇预处理3~5秒，放至转膜缓冲液浸润半小时。
- [0075] 2、取出凝胶，将其放至滤纸上，形成凝胶转印堆积层，滤纸，凝胶，PVDF膜，滤纸，凝胶转印堆积层这样的“三明治”结构。此操作必须将气泡完全去除。
- [0076] 3、按正负极方向放置转印夹。
- [0077] 4、低温条件下，100V恒压116分钟。
- [0078] 五、免疫印记
- [0079] 1.取出杂交膜，TBST漂洗5min，1次。
- [0080] 2.5%脱脂奶粉溶液室温封闭1小时。
- [0081] 3.TBST洗膜10min，1次。
- [0082] 4.合适的一抗稀释浓度4 $^{\circ}$ C过夜。
- [0083] 5.TBST洗膜10min，4次。
- [0084] 6.相应二抗稀释液37 $^{\circ}$ C孵育1h。
- [0085] 7.TBST洗膜10min，4次。
- [0086] 8.将杂交膜置于一透明塑料板上，注意不要让膜干燥。
- [0087] 9.用一干净移液器将化学荧光发光底物均匀地加到膜的表面，并使反应持续5min。
- [0088] 10.用试剂盒提供的滤纸吸去膜表面多余的底物溶液，放至暗盒。
- [0089] 11.显影。
- [0090] 试剂配方及主要仪器、耗材、试剂的厂商及货号
- [0091] ①10*电泳缓冲液
- [0092] 144g Glycine

- [0093] 30g Tris-Base
- [0094] 10g SDS
- [0095] 加800mL纯水溶解后溶至1L室温保存。使用时100mL10*缓冲液加900ml纯水稀释至1*使用。
- [0096] ②10*转膜缓冲液
- [0097] 154g Glycine
- [0098] 30g Tris-Base
- [0099] 加800mL纯水溶解后溶至1L室温保存。使用时100mL 10*转膜缓冲液加入200mL甲醇再用纯水定容至1L使用。
- [0100] ③5*Loading Buffer
- [0101] 1.25mL 1M Tris-HCL (PH6.8)
0.5g SDS
- [0102] 25mg BPB (溴酚蓝)
2.5mL 甘油
- [0103] 加去离子水溶解后定溶至5mL。使用时每1mL Loading Buffer加入50μL β-巯基乙醇。
- [0104] ④Tis缓冲液配方 (0.5M pH7.6)
- [0105] Tris-Base 60.57g
- [0106] 加800mL纯水溶解后,浓盐酸调pH至7.6,定容至1L。
- [0107] ⑤1*TBS (TBST)
- [0108] 先用少量纯水溶解8.5gNaCl,后加入0.5MTis缓冲液100mL,定容至1L,即为1*TBS。加入0.1%的Tween-20。
- [0109] ⑥RIPA裂解液
- | | | | | |
|--------|-------|----------------|---------|-------------|
| | 50mM | Tris-HCL PH7.4 | 2mL | 1M Tris-HCL |
| | | PH7.4 | | |
| | 150mM | NaCL | 1.2mL | 5M NaCL |
| | 1mM | EDTA | 80 μ L | 0.5M EDTA |
| [0110] | 1% | Triton X-100 | 400 μ L | Triton |
| | | X-100 | | |
| | 0.5% | 脱氧胆酸钠 | 0.2g | 脱氧胆酸钠 |
| | 0.1% | SDS | 400 μ L | |
- [0111] 使用时1:100加入100mMPMSF、100*Cocktail、磷酸酶抑制剂
- [0112] ⑦定影液
- [0113] 240g 硫代硫酸钠
- [0114] 25g 无水亚硫酸钠
- [0115] 48mL 冰乙酸

[0116] 加纯水溶解后定容至1L。

[0117] 四、酶联免疫吸附实验 (ELISA)

[0118] 标准品的稀释:按下表稀释标准品制作标准曲线。

[0119] 200pg/ml	5号标准品	150μl的原倍标准品加入150μl标准品稀释液
100pg/ml	4号标准品	150μl的5号标准品加入150μl标准品稀释液
50pg/ml	3号标准品	150μl的4号标准品加入150μl标准品稀释液
25pg/ml	2号标准品	150μl的3号标准品加入150μl标准品稀释液
12.5pg/ml	1号标准品	150μl的2号标准品加入150μl标准品稀释液

[0120] 2.加样:分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50μl,待测样品孔中先加样品稀释液40μl,然后再加待测样品10μl(样品最终稀释倍数为5倍)。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀。

[0121] 3.温育:用封板膜封板后置37℃温育30min。

[0122] 4.配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释30倍后备用

[0123] 5.洗涤:小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30s后弃去,如此重复5次,拍干。

[0124] 6.加酶:每孔加入酶标试剂50μl,空白孔除外。

[0125] 7.温育:操作同3。

[0126] 8.洗涤:操作同5。

[0127] 9.显色:每孔先加入显色剂A 50μl,再加入显色剂B 50μl,轻轻震荡混匀,37℃避光显色15min。

[0128] 10.终止:每孔加终止液50μl,终止反应(此时蓝色立转黄色)。

[0129] 11.测定:以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。测定应在加终止液后15min以内进行。

[0130] 以上的仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

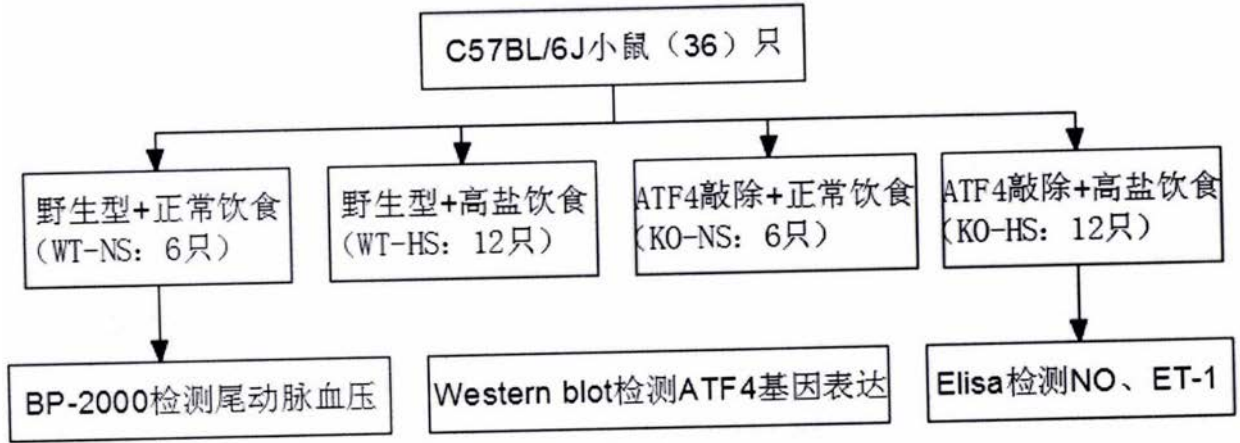


图1

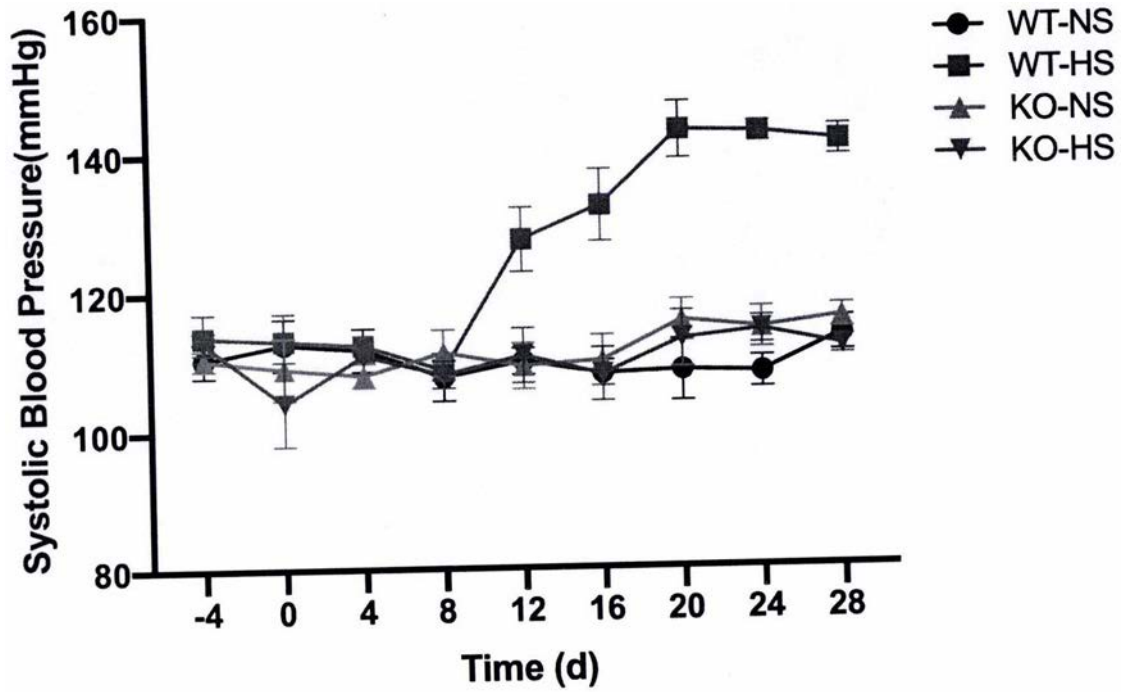


图2

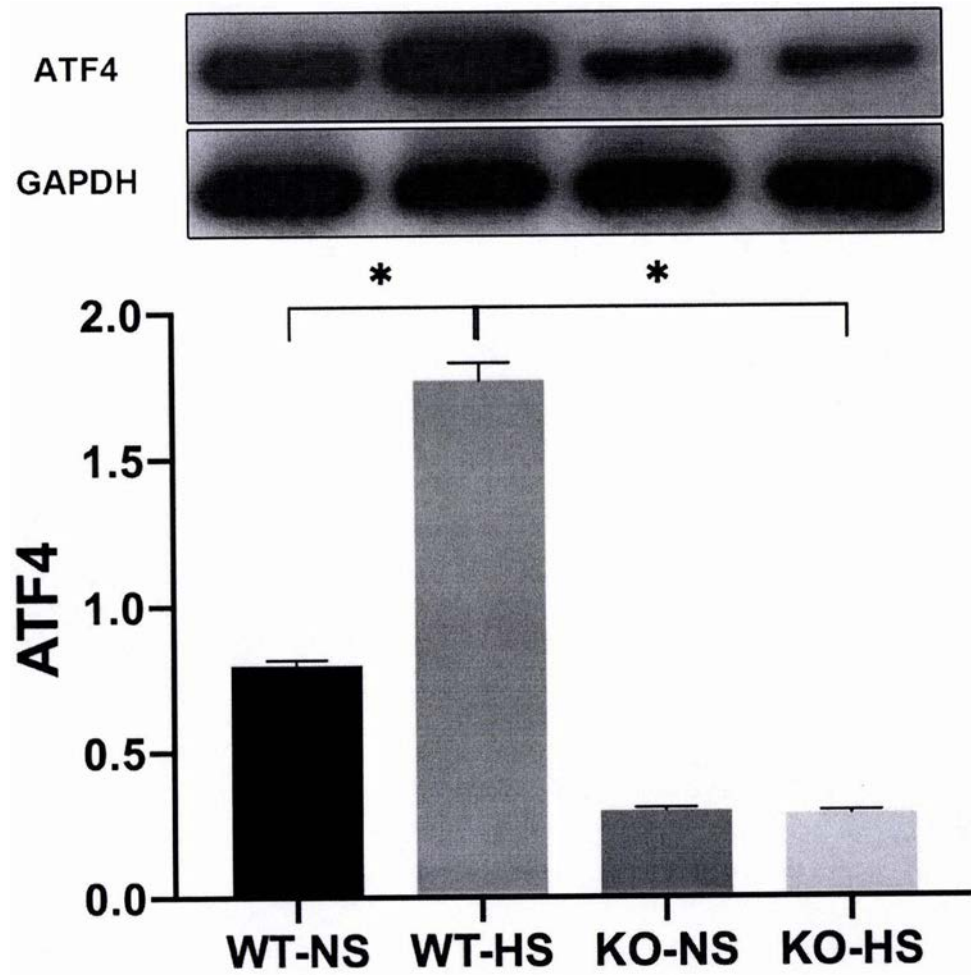


图3

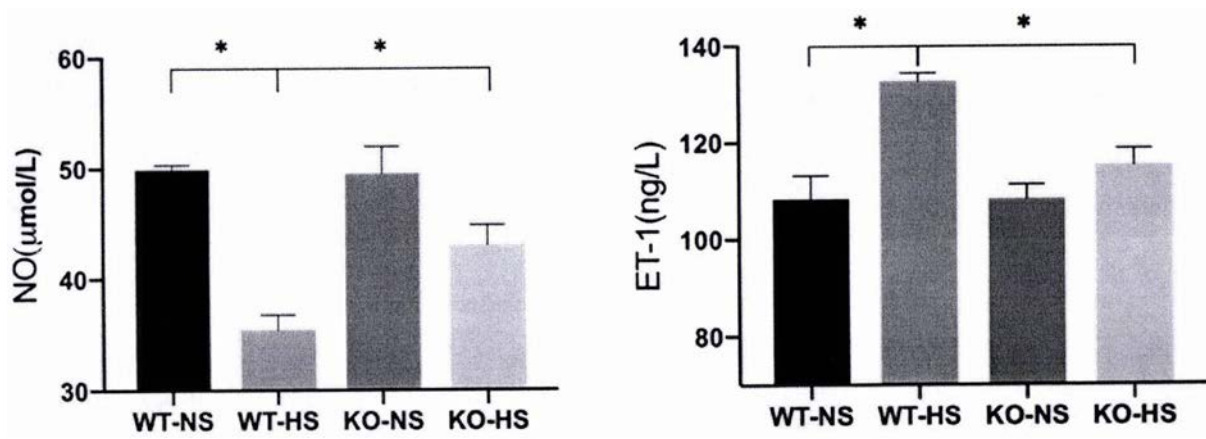


图4

专利名称(译)	能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4		
公开(公告)号	CN110531084A	公开(公告)日	2019-12-03
申请号	CN201910746765.2	申请日	2019-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	暨南大学		
申请(专利权)人(译)	暨南大学		
当前申请(专利权)人(译)	暨南大学		
[标]发明人	陈利国 陈伟豪 刘天浩 肖雅 周永红 何玲 袁静 陈旭东		
发明人	陈利国 陈伟豪 刘天浩 方梅霞 肖雅 周永红 何玲 袁静 许清芸 陈旭东 陶文聪		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N27/447 A61B5/022		
CPC分类号	A61B5/022 A61B5/02233 G01N27/44717 G01N33/53 G01N33/6893		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4，涉及医药技术领域，该能够阻滞高盐诱导小鼠升高的基因-ATF4中ATF4在高盐诱导小鼠高血压中的作用，发现敲除或敲低ATF4可阻滞高盐诱导小鼠的血压升高。敲除或敲低ATF4基因对血管具有保护作用。

