



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106892981 A

(43)申请公布日 2017.06.27

(21)申请号 201710154098.X

(22)申请日 2017.03.15

(71)申请人 武汉大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区科技园
南区科苑南路武汉大学深圳产学研大
楼A304室

(72)发明人 杜海宁 程晓庆 赵梦洁

(74)专利代理机构 广东德而赛律师事务所
44322

代理人 叶秀进

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

C07K 16/06(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

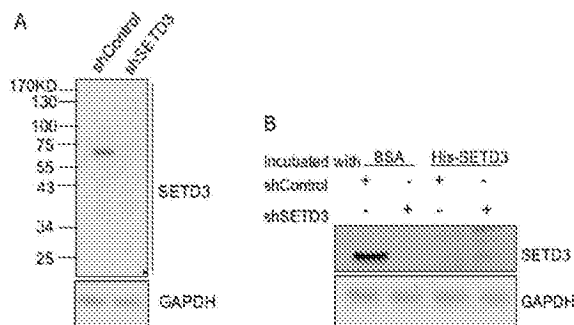
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,包括以下步骤:用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子并提取被免疫兔子的血清;用Affi-Gel偶联的GST标签的全长SETD3蛋白纯化兔子的血清。本发明的SETD3抗体可用于免疫印迹(WB)、免疫荧光(IF)、免疫组化(IHC)、以及免疫沉淀(IP)多种用途,且效价和特异性较高。



1. 一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
 - a) 用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子并提取被免疫兔子的血清;
 - b) 用Affi-Gel偶联的GST标签的全长SETD3蛋白纯化兔子的血清。
2. 根据权利要求1所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子时间为:主注射、主注射后的第28天、主注射后的第42天、主注射后的第60天、主注射后的第78天。
3. 根据权利要求2所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,免疫主注射后的第102天提取被免疫兔子的血清。
4. 根据权利要求2所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,主注射0.5mg抗原、主注射后的第28天注射0.6mg抗原、主注射后的第42天注射0.6mg抗原、主注射后的第60天注射0.4mg抗原、主注射后的第78天注射0.4mg抗原。
5. 根据权利要求2所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白为经镍柱树脂纯化后蛋白。
6. 根据权利要求1所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,用Affi-Gel偶联GST标签的全长SETD3蛋白步骤包括:
 - c) 用谷胱甘肽树脂纯化GST标签的全长SETD3蛋白;
 - d) 将GST标签纯化的SETD3蛋白透析两次,将透析后GST标签纯化的SETD3蛋白蛋白质与事先用冷水平衡的Affi-Gel 15树脂在4摄氏度下偶联十二小时;
 - e) 用PBS溶液清洗Affi-Gel柱子;
 - f) 用柠檬酸钠溶液清洗柱子并用该溶液平衡Affi-Gel柱子;
 - g) 将平衡后Affi-Gel柱子与庚二亚氨酸二甲酯在室温下反应30分钟;
 - h) 用Tris-HCl溶液终止反应2小时后,并用PBS溶液清洗Affi-Gel柱子。
7. 根据权利要求6所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,加入兔子的血清到Affi-Gel柱子上,并与Affi-Gel柱子在4摄氏度孵育十二小时。
8. 根据权利要求7所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,用TBS-T溶液清洗Affi-Gel柱子,用Glycine溶液洗脱结合的抗体,收集的抗体用Tris-HCl溶液中和洗脱液。
9. 根据权利要求8所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,测定所收集抗体的浓度,并浓缩抗体到1mg/ml的浓度,用PBS溶液透析浓缩的抗体十二小时后,在其中加入10%的甘油,分装后零下80摄氏度保存。
10. 根据权利要求1所述用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,其特征在于,N端6xHis标签的全长SETD3和GST标签的全长人源SETD3蛋白均为克隆基因,并在大肠杆菌中进行表达。

用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学技术领域,特别是涉及一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法。

背景技术

[0002] SETD3是一个具有经典SET保守结构(Su(var)3-9,Enhancer-of-zeste以及Trithorax)的一个甲基化转移酶。SETD3自身还包含有一个称为Rubis-sub-bind的结构域。SETD3首次被发现是因为其转录本水平在喂食过程中被调控。研究发现,斑马鱼中的SETD3具有对组蛋白H3K36位残基的单、双、三甲基化功能以及通过诱导caspase-3的激活进而抑制细胞生存能力的功能。最近的研究显示,鼠源的SETD3可以通过结合在肌生因子myogenin的启动子处来诱导肌肉细胞的分化过程,因此鼠源的SETD3在此处扮演了转录因子的角色,相对应的,鼠源的SETD3被证明具有组蛋白H3K4和H3K36位的甲基化转移酶活性。人源的SETD3蛋白被发现可以跟很多蛋白质发生相互作用,其中可以甲基化转录因子FoxM1。两者的结合可以抑制VEGF的转录。

[0003] 鉴于SETD3蛋白的多种功能,研究该蛋白的重要工具——抗体的优劣决定了实验结果的可靠性。目前商品化的SETD3兔多克隆抗体有Abcam(ab177582),abcam(ab200950),Sigma(HPA003639),Thermo fisher(PA5-43675),Atlas(HPA003591);鼠单克隆抗体有Thermo Fisher(730058)。这些抗体除了Atlas抗体显示可以用于免疫荧光外,其他抗体都只能用于Western blot实验。但是Atlas抗体的效价不高,稀释比例均大于1:1000。

发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法。

[0005] 本发明的技术方案如下:一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0006] a) 用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子并提取被免疫兔子的血清;

[0007] b) 用Affi-Gel偶联的GST标签的全长SETD3蛋白纯化兔子的血清。

[0008] 优选地,用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子时间为:主注射、主注射后的第28天、主注射后的第42天、主注射后的第60天、主注射后的第78天。

[0009] 优选地,免疫主注射后的第102天提取被免疫兔子的血清。

[0010] 优选地,主注射0.5mg抗原、主注射后的第28天注射0.6mg抗原、主注射后的第42天注射0.6mg抗原、主注射后的第60天注射0.4mg抗原、主注射后的第78天注射0.4mg抗原。

[0011] 优选地,N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白为经镍柱树脂纯化后蛋白。

[0012] 优选地,用Affi-Gel偶联GST标签的全长SETD3蛋白步骤包括:

[0013] c) 用谷胱甘肽树脂纯化GST标签的全长SETD3蛋白;

[0014] d) 将GST标签纯化的SETD3蛋白透析两次,将透析后GST标签纯化的SETD3蛋白蛋白

质与事先用冷水平衡的Affi-Gel 15树脂在4摄氏度下偶联十二小时；

[0015] e) 用PBS溶液清洗Affi-Gel柱子；

[0016] f) 用柠檬酸钠溶液清洗柱子并用该溶液平衡Affi-Gel柱子；

[0017] g) 将平衡后Affi-Gel柱子与庚二亚氨酸二甲酯在室温下反应30分钟；

[0018] h) 用Tris-HCl溶液终止反应2小时后，并用PBS溶液清洗Affi-Gel柱子。

[0019] 优选地，加入兔子的血清到Affi-Gel柱子上，并与Affi-Gel柱子在4摄氏度孵育十二小时。

[0020] 优选地，用TBS-T溶液清洗Affi-Gel柱子，用Glycine溶液洗脱结合的抗体，收集的抗体用Tris-HCl溶液中和洗脱液。

[0021] 优选地，测定所收集抗体的浓度，并浓缩抗体到1mg/ml的浓度，用PBS溶液透析浓缩的抗体十二小时后，在其中加入10%的甘油，分装后零下80摄氏度保存。

[0022] 优选地，N端6xHis标签的全长SETD3和GST标签的全长人源SETD3蛋白均为克隆基因，并在大肠杆菌中进行表达。

[0023] 本发明的有益效果是：本发明的SETD3抗体可用于免疫印迹(WB)、免疫荧光(1F)、免疫组化(1HC)、以及免疫沉淀(1P)多种用途，且效价和特异性较高。

[0024] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步描述。

附图说明

[0025] 图1是检测本发明优选实施例兔源SETD3抗体特异性的分析图；

[0026] 图2是免疫荧光实验检验本发明优选实施例兔源SETD3抗体的分析图。

具体实施方式

[0027] 为了更充分理解本发明的技术内容，下面结合具体实施例对本发明的技术方案进一步介绍和说明。

[0028] 一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法优选实施例：

[0029] 1、克隆N端6xHis和GST标签的全长人源SETD3蛋白基因，并在大肠杆菌中进行表达。

[0030] 2、用镍柱树脂纯化N端6xHis标签SETD3蛋白，用谷胱甘肽树脂纯化GST标签的SETD3蛋白各5mg。

[0031] 3、用纯化N端His标签SETD3蛋白同时免疫两只新西兰大兔子，主注射0.5mgN端His标签SETD3蛋白抗原、在主注射后第28天注射0.6mgN端His标签SETD3蛋白抗原、在主注射后第42天注射0.6mgN端His标签SETD3蛋白抗原、在主注射后第60天注射0.4mgN端His标签SETD3蛋白抗原、在主注射后第78天注射0.4mgN端His标签SETD3蛋白抗原，共5次免疫新西兰大白兔。在免疫后第102天处死兔子后提取血清。

[0032] 4、将5mg的GST标签纯化的SETD3蛋白在0.1M MOPS、pH7.5的溶液中透析两次。将透析后的蛋白质与事先用冷水平衡的Affi-Gel 15树脂在4摄氏度偶联十二小时。

[0033] 5、用10个柱体积的PBS溶液清洗Affi-Gel柱子5次，然后用0.2M的柠檬酸钠溶液(pH9.0)清洗Affi-Gel柱子一次并用该溶液平衡柱子，再行加入20mM的庚二亚氨酸二甲酯DMP，在室温(17至25摄氏度)下反应30分钟，然后用1M Tris-HCl pH 7.7的溶液终止反应2

小时,并用10个柱体积的PBS溶液清洗Affi-Gel柱子。

[0034] 6、加入15ml的所提取的兔子血清到Affi-Gel柱子上,与

[0035] Affi-Gel柱子在4摄氏度下孵育十二小时后,用TBS-T溶液清洗Affi-Gel柱子10次,再用0.1M Glycine、pH 2.5的溶液洗脱结合的抗体,每1ml组分收集为一管,并用2M Tris-HCl、pH 8.5的溶液中和洗脱液。

[0036] 7、测定所收集抗体浓度,并浓缩抗体到1mg/ml的浓度,用PBS

[0037] 溶液透析抗体十二小时,然后将抗体溶液中加入10%的甘油,分装后零下80摄氏度保存。

[0038] 将上述步骤所获得抗体兔源SETD3抗体进行特异性分析,所得结果如图1所示:

[0039] A图在HeLa细胞中,分别构建了稳转空载(shControl)或敲低SETD3(shSETD3)的稳定细胞系,用自己制备的抗体Western Blot检测两种细胞中的SETD3的蛋白表达水平,其中GAPDH为内参。SETD3抗体稀释比例:1:5000

[0040] B图在经过抗原亲和层析纯化的SETD3抗体中分别加入BSA以及原核表达纯化的His标签的SETD3蛋白,然后将这两种抗体作为一抗分别与A图中构建的稳定细胞系样品进行抗体孵育2个小时,Western Blot检测空载和shSETD3细胞系中SETD3的蛋白表达水平,其中GAPDH为内参。结论:本发明的兔源SETD3抗体特异性较高,可以有效识别内源的SETD3蛋白。

[0041] 免疫荧光实验检验上述兔源SETD3抗体,所得结果如图2所示;在稳定转染空载(shControl)或敲低SETD3(shSETD3)的细胞中用制备的SETD3抗体进行免疫荧光反应实验。DAPI代表细胞核的染色情况;SETD3代表本发明所制备的SETD3抗体免疫检测细胞内源的SETD3蛋白定位情况(一抗稀释比例:1:2000);MERGE代表前两张免疫信号的叠加。shControl代表对照组,shSETD3代表用shRNA特异性敲低内源SETD3蛋白。由图2可见,敲低SETD3后,SETD3在细胞质中的定位信号明显减弱。结论:敲低SETD3的样品证明抗体识别的高特异性。

[0042] 以上所述仅以实施例来进一步说明本发明的技术内容,以便于读者更容易理解,但不代表本发明的实施方式仅限于此,任何依本发明所做的技术延伸或再创造,均受本发明的保护。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

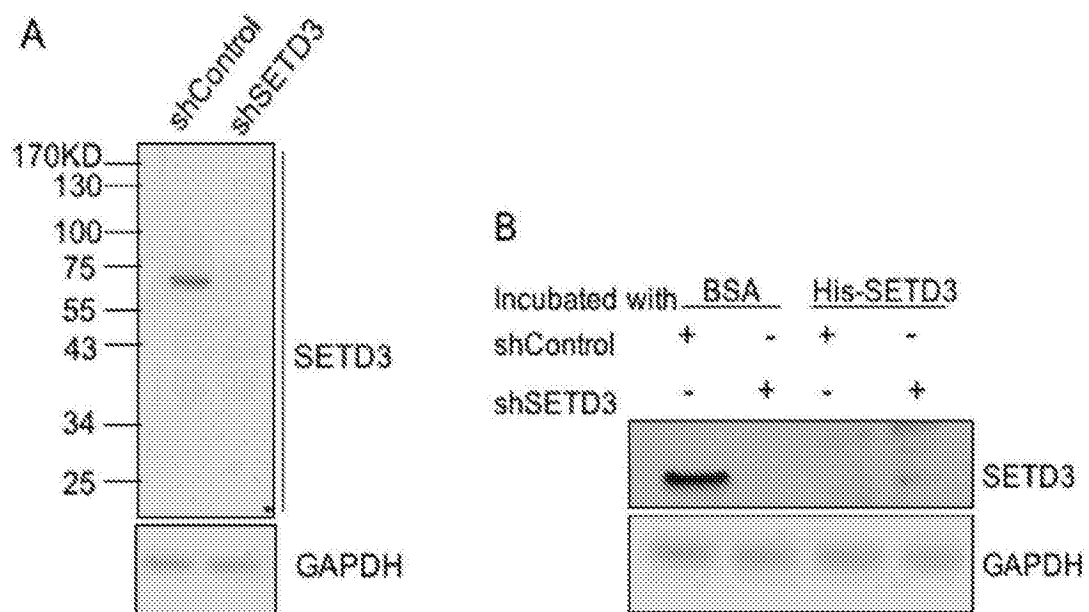


图1

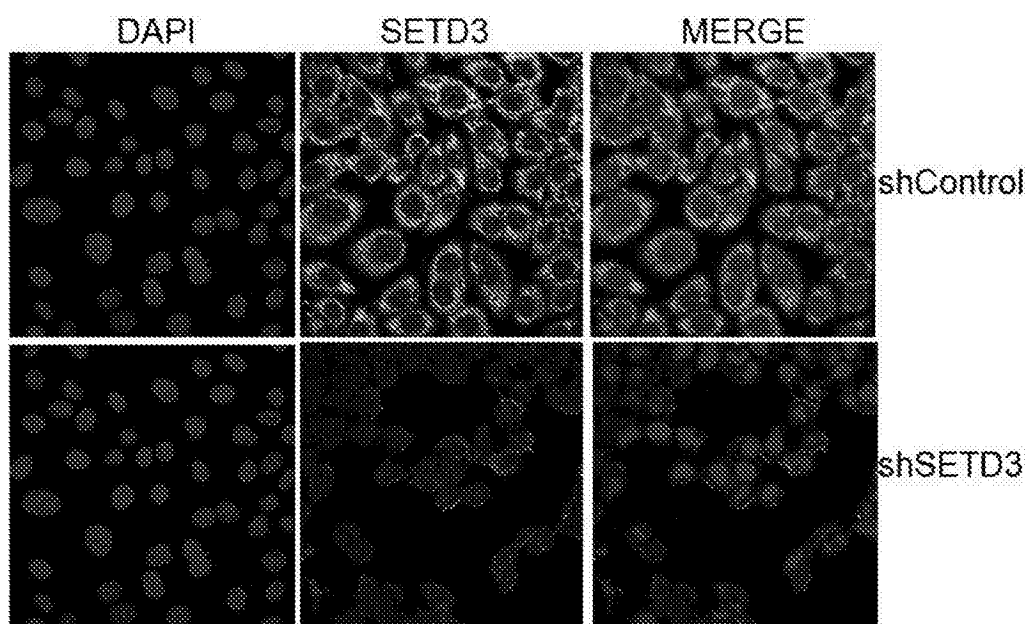


图2

专利名称(译)	用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法		
公开(公告)号	CN106892981A	公开(公告)日	2017-06-27
申请号	CN201710154098.X	申请日	2017-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学深圳研究院		
申请(专利权)人(译)	武汉大学深圳研究院		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学深圳研究院		
[标]发明人	杜海宁 程晓庆 赵梦洁		
发明人	杜海宁 程晓庆 赵梦洁		
IPC分类号	C07K16/40 C07K16/06 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/40 C07K16/06 C07K16/065 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于免疫荧光检测的SETD3抗体的制备方法，包括以下步骤：用N端6xHis标签的全长SETD3表达的蛋白免疫兔子并提取被免疫兔子的血清；用Affi-Gel偶联的GST标签的全长SETD3蛋白纯化兔子的血清。本发明的SETD3抗体可用于免疫印迹(WB)、免疫荧光(IF)、免疫组化(IHC)、以及免疫沉淀(IP)多种用途，且效价和特异性较高。

