



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108241055 A

(43)申请公布日 2018.07.03

(21)申请号 201711467623.X

(22)申请日 2017.12.29

(71)申请人 苏州同因生物科技有限公司

地址 215558 江苏省苏州市常熟高新技术
开发区湖山路333号同济科技广场1幢
2004

(72)发明人 李旦

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/539(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方

(57)摘要

本发明涉及一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,其特征在于包括裂解缓冲液、蛋白质交联缓冲液、免疫沉淀磁珠、孵育缓冲液、洗脱缓冲液、上样缓冲液,所述组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂能够显著降低了实验中抗体链的污染,提高基因检测的准确度。

1. 本发明涉及一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方, 其特征在于:

包括裂解缓冲液、蛋白质交联缓冲液、免疫沉淀磁珠、孵育缓冲液、洗脱缓冲液和上样缓冲液;

所述各组分按重量份配比为: 所述裂解缓冲液10-20份, 所述蛋白质交联缓冲液10-20份, 所述免疫沉淀磁珠1-1.5份, 所述孵育缓冲液40-60份, 所述洗脱缓冲液20-30份, 所述上样缓冲液15-20份;

所述裂解缓冲液由Tris、10mMNP-40溶液、10mM钒酸钠溶液、10mMEDTA溶液、10mM氟化钠溶液、10mM碳酸氢钠溶液、200mM盐酸溶液和40mM磷酸钾溶液调配制成; 以所述裂解缓冲液为100重量份, 所述Tris的含量比例优选3-10重量份范围; 所述10mMNP-40溶液的含量比例优选15-20重量份范围; 所述10mM钒酸钠溶液的含量比例优选8-20重量份范围; 所述10mMEDTA溶液的含量比例优选5-15重量份范围; 所述10mM氟化钠溶液的含量比例优选5-15重量份范围; 所述10mM碳酸氢钠溶液的含量比例优选25-40重量份范围; 用所述200mM的盐酸溶液的含量比例优选2-8重量份范围; 余下部分为所述40mM磷酸钾溶液;

所述蛋白质交联缓冲液由20mM磷酸铝氢钠溶液、20mM磷酸钾溶液、5mM氯化钠溶液、25mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液和20mM氯化钾溶液调配制成; 以所述蛋白质交联缓冲液为100重量份, 所述20mM磷酸铝氢钠溶液的含量比例优选15-40重量份范围; 所述20mM磷酸钾溶液的含量比例优选2-10重量份范围; 所述5mM氯化钠溶液的含量比例优选5-30重量份范围; 所述25mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液的含量比例优选2-15重量份范围; 余下部分为所述20mM氯化钾溶液; 蛋白质分子在所述蛋白质交联缓冲液中发生硫氢基与硫氢基的氧化型交联, 从而生成二硫键, 蛋白质分子交联度用公式一计算:

$$\text{公式一: } Y = \frac{3n^2}{\ln(1+n)} \times 100\%$$

其中, Y代表所述蛋白质交联度, Y为大于等于1的百分数; n代表所述蛋白质分子生成的所述二硫键的个数, n取大于等于1的正整数;

所述免疫沉淀磁珠包括Fe₃O₄磁珠核, 所述Fe₃O₄磁珠核形状为球形, 粒径50-100nm; 以所述裂解缓冲液为100重量份, 所述免疫沉淀磁珠的含量比例优选0.2-1重量份范围; 所述Fe₃O₄磁珠核制备过程为: 取冷冻干燥过的所述Fe₃O₄磁珠核分散到极性有机溶剂中超声处理后, 加入溶解于所述极性有机溶剂中的分散剂, 搅拌后, 滴加溶解于所述极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子, 滴加完毕后反应6-8h; 反应结束后, 磁分离出所述Fe₃O₄磁珠核, 依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤所述Fe₃O₄磁珠核, 直至至洗涤液pH值为6.5-7, 超声处理15-30min; 所述Fe₃O₄磁珠核用40mMMES缓冲液清洗2-3次, 重悬所述Fe₃O₄磁珠核于所述40mMMES缓冲液中, 加入活化剂碳二亚胺将所述Fe₃O₄磁珠核活化;

所述孵育缓冲液由10mM氟化钠溶液、20mM甘油、10mM焦磷酸钠酶抑制剂、30mM亮氨酸酶素溶液、15mM蛋白酶抑制剂和10mM磷酸钾溶液调配制成; 以所述孵育缓冲液为100重量份, 所述10mM氟化钠的含量比例优选2-8重量份范围; 所述20mM甘油的含量比例优选10-35重量份范围; 所述10mM焦磷酸钠酶抑制剂的含量比例优选1-5重量份范围; 所述30mM亮氨酸酶素溶液的含量比例优选1.5-8重量份范围; 所述15mM蛋白酶抑制剂的含量比例优选0.5-2.5重量份范围; 余下部分为所述10mM磷酸钾溶液;

所述洗脱缓冲液由20mM二甲亚砜溶液、15mM苯甲基磺酰氟溶液、10mMNP-40溶液、5mM钒

酸钠溶液、10mM抑胰肽酶溶液和10mM磷酸钾溶液调配制成；以所述洗脱缓冲液为100重量份，所述20mM二甲亚砷溶液的含量比例优选0.5-10重量份范围；所述15mM苯甲基磺酰氟溶液的含量比例优选20-30重量份范围；所述10mMNP-40溶液的含量比例优选5-20重量份范围；所述5mM钒酸钠溶液的含量比例优选20-35重量份范围；所述10mM抑胰肽酶溶液的含量比例优选0.5-1.5重量份范围；余下部分为所述10mM磷酸钾溶液；

所述上样缓冲液由20mM乙酸乙酯溶液、15mMSDS溶液、6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料和15mM氯化钠溶液调配制成；以所述上样缓冲液为100重量份，所述20mM乙酸乙酯溶液的含量比例优选25-35重量份范围；所述15mM SDS溶液的含量比例优选15-45重量份范围；所述6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料含量比例优选0.2-0.8重量份范围；余下部分为所述15mM氯化钠溶液。

一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学领域,具体涉及一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方;

背景技术

[0002] 每个蛋白并不是独立的在细胞中完成所赋予的功能,在细胞复杂结构和高度有序的通路网络中,通常与其它蛋白质相互作用形成大的复合物,而蛋白质与蛋白质之间的相互作用是蛋白质发挥生物功能的重要途径。

[0003] 免疫共沉淀是以抗体和抗原之间特异性结合为基础的用于研究蛋白质相互作用的经典技术。主要利用非变性剂裂解完整细胞,维持了细胞内许多蛋白质间的相互作用,便于检测蛋白质之间的相互作用。利用抗蛋白质A的抗体与A形成免疫复合物并沉淀,而细胞内与A稳定结合的蛋白质B同时被沉淀下来。蛋白质B的沉淀是基于与A的物理性相互作用,这种技术被称为免疫共沉淀。所述技术利用抗原抗体形成蛋白复合物沉淀,将蛋白质复合物溶解,再通过对抗体的亲和层析将蛋白复合物分离纯化出来,进而通过二维电泳。SDS-PAGE或质谱等技术鉴定分离得到的蛋白。由于加样缓冲液中含有巯基乙醇会导致抗体的重链与轻链之间的二硫键破坏,从而使得抗体分子变成重链分子 (55KD) 和轻链分子 (25KD)。因此,在免疫印迹显色反应中,除了能检测到目的蛋白外,还能检测到重链和轻链分子。通常用于免疫沉淀的抗体量非常大 (1 μ g),所以当目的蛋白的大小接近重链或者轻链分子时,重链或者轻链分子的免疫印迹信号常常由于重链或者轻链信号过强而影响目的蛋白的检测结果。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方,其特征在于:

[0005] 包括裂解缓冲液、蛋白质交联缓冲液、免疫沉淀磁珠、孵育缓冲液、洗脱缓冲液和上样缓冲液;各组分按重量份配比为:裂解缓冲液10-20份,蛋白质交联缓冲液10-20份,免疫沉淀磁珠1-1.5份,孵育缓冲液40-60份,洗脱缓冲液20-30份,上样缓冲液15-20份;

[0006] 裂解缓冲液由Tris、10mMNP-40溶液、10mM钒酸钠溶液、10mMEDTA溶液、10mM氯化钠溶液、10mM碳酸氢钠溶液、200mM盐酸溶液和40mM磷酸钾溶液调配制成;以裂解缓冲液为100重量份,Tris的含量比例优选3-10重量份范围;10mMNP-40溶液的含量比例优选15-20重量份范围;10mM钒酸钠溶液的含量比例优选8-20重量份范围;10mMEDTA溶液的含量比例优选5-15重量份范围;10mM氯化钠溶液的含量比例优选5-15重量份范围;10mM碳酸氢钠溶液的含量比例优选25-40重量份范围;用200mM的盐酸溶液的含量比例优选2-8重量份范围;余下部分为40mM磷酸钾溶液;

[0007] 蛋白质交联缓冲液由20mM磷酸铝氢钠溶液、20mM磷酸钾溶液、5mM氯化钠溶液、25mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液和20mM氯化钾溶液调配制成;以蛋白质交联缓冲液为100重量份,20mM磷酸铝氢钠溶液的含量比例优选15-40重量份范围;20mM磷酸钾溶液的含量比例优选2-10重量份范围;5mM氯化钠溶液的含量比例优选5-30重量份范围;25mM4-羟乙基哌嗪

乙磺酸溶液的含重比例优选2-15重量份范围；余下部分为20mM氯化钾溶液；蛋白质分子在蛋白质交联缓冲液发生巯基与巯基的氧化型交联，从而生成二硫键，蛋白质分子交联度用公式一计算：

[0008] 公式一：
$$Y = \frac{3n^2}{\ln(1+n)} \times 100\%$$

[0009] 其中，Y代表蛋白质交联度，Y为大于等于1的百分数；n代表蛋白质分子生成的二硫键的个数，n取大于等于1的正整数；

[0010] 免疫沉淀磁珠包括Fe₃O₄磁珠核，Fe₃O₄磁珠核形状为球形，粒径50-100nm；以裂解缓冲液为100重量份，免疫沉淀磁珠的含重比例优选0.2-1重量份范围；Fe₃O₄磁珠核制备过程为：取冷冻干燥过的Fe₃O₄磁珠核分散到极性有机溶剂中超声处理后，加入溶解于极性有机溶剂中的分散剂，搅拌后，滴加溶解于极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子，滴加完毕后反应6-8h；反应结束后，磁分离出Fe₃O₄磁珠核，依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤Fe₃O₄磁珠核，直至至洗涤液pH值为6.5-7，超声处理15-30min；Fe₃O₄磁珠核用40mM MES缓冲液清洗2-3次，重悬Fe₃O₄磁珠核于40mM MES缓冲液中，加入活化剂碳二亚胺将Fe₃O₄磁珠核活化；

[0011] 孵育缓冲液由10mM氟化钠溶液、20mM甘油、10mM焦磷酸钠酶抑制剂、30mM亮氨酸胺溶液、15mM蛋白酶抑制剂和10mM磷酸钾溶液调配制成；以孵育缓冲液为100重量份，10mM氟化钠的含重比例优选2-8重量份范围；20mM甘油的含重比例优选10-35重量份范围；10mM焦磷酸钠酶抑制剂的含重比例优选1-5重量份范围；30mM亮氨酸胺溶液的含重比例优选1.5-8重量份范围；15mM蛋白酶抑制剂的含重比例优选0.5-2.5重量份范围；余下部分为10mM磷酸钾溶液；

[0012] 洗脱缓冲液由20mM二甲亚砜溶液、15mM苯甲基磺酰氟溶液、10mMNP-40溶液、5mM钒酸钠溶液、10mM抑胰蛋白酶溶液和10mM磷酸钾溶液调配制成；以洗脱缓冲液为100重量份，20mM二甲亚砜溶液的含重比例优选0.5-10重量份范围；15mM苯甲基磺酰氟溶液的含重比例优选20-30重量份范围；10mMNP-40溶液的含重比例优选5-20重量份范围；5mM钒酸钠溶液的含重比例优选20-35重量份范围；10mM抑胰蛋白酶溶液的含重比例优选0.5-1.5重量份范围；余下部分为10mM磷酸钾溶液；

[0013] 上样缓冲液由20mM乙酸乙酯溶液、15mM SDS溶液、6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料和15mM氯化钠溶液调配制成；以上样缓冲液为100重量份，20mM乙酸乙酯溶液的含重比例优选25-35重量份范围；15mM SDS溶液的含重比例优选15-45重量份范围；6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料的含重比例优选0.2-0.8重量份范围；余下部分为15mM氯化钠溶液。

[0014] 本发明的有益成果为：本发明提供了一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方，能够提高免疫共沉淀方法的特异性，使之具有稳定性和可重复性的特点，提高了实验效率，为深入的进行分子生物学、分子肿瘤学、细胞生物学、生物化学等学科的研究提供了有益的帮助。

具体实施方式

[0015] 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:

[0016] 实施例1:有鉴于此,本发明提供了一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方,其特征在于:

[0017] 包括裂解缓冲液、蛋白质交联缓冲液、免疫沉淀磁珠、孵育缓冲液、洗脱缓冲液和上样缓冲液;各组分按重量份配比为:裂解缓冲液10-20份,蛋白质交联缓冲液10-20份,免疫沉淀磁珠1-1.5份,孵育缓冲液40-60份,洗脱缓冲液20-30份,上样缓冲液15-20份;

[0018] 裂解缓冲液由Tris、10mMNP-40溶液、10mM钒酸钠溶液、10mMEDTA溶液、10mM氟化钠溶液、10mM碳酸氢钠溶液、200mM盐酸溶液和40mM磷酸钾溶液调配制成;以裂解缓冲液为100重量份,Tris的含量比例优选3-10重量份范围;10mMNP-40溶液的含量比例优选15-20重量份范围;10mM钒酸钠溶液的含量比例优选8-20重量份范围;10mMEDTA溶液的含量比例优选5-15重量份范围;10mM氟化钠溶液的含量比例优选5-15重量份范围;10mM碳酸氢钠溶液的含量比例优选25-40重量份范围;用200mM的盐酸溶液的含量比例优选2-8重量份范围;余下部分为40mM磷酸钾溶液;

[0019] 蛋白质交联缓冲液由20mM磷酸铝氢钠溶液、20mM磷酸钾溶液、5mM氯化钠溶液、25mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液和20mM氯化钾溶液调配制成;以蛋白质交联缓冲液为100重量份,20mM磷酸铝氢钠溶液的含量比例优选15-40重量份范围;20mM磷酸钾溶液的含量比例优选2-10重量份范围;5mM氯化钠溶液的含量比例优选5-30重量份范围;25mM4-羟乙基哌嗪乙磺酸溶液的含量比例优选2-15重量份范围;余下部分为20mM氯化钾溶液;蛋白质分子在蛋白质交联缓冲液发生硫氢基与硫氢基的氧化型交联,从而生成二硫键,蛋白质分子交联度用公式一计算:

[0020] 公式一:
$$Y = \frac{3n^2}{\ln(1+n)} \times 100\%$$

[0021] 其中,Y代表蛋白质交联度,Y为大于等于1的百分数;n代表蛋白质分子生成的二硫键的个数,n取大于等于1的正整数;

[0022] 免疫沉淀磁珠包括Fe₃O₄磁珠核,Fe₃O₄磁珠核形状为球形,粒径50-100nm;以裂解缓冲液为100重量份,免疫沉淀磁珠的含量比例优选0.2-1重量份范围;Fe₃O₄磁珠核制备过程为:取冷冻干燥过的Fe₃O₄磁珠核分散到极性有机溶剂中超声处理后,加入溶解于极性有机溶剂中的分散剂,搅拌后,滴加溶解于极性有机溶剂的带有双端羧基的有机小分子,滴加完毕后反应6-8h;反应结束后,磁分离出Fe₃O₄磁珠核,依次用无水乙醇及去离子水反复洗涤Fe₃O₄磁珠核,直至至洗涤液pH值为6.5-7,超声处理15-30min;Fe₃O₄磁珠核用40mMMES缓冲液清洗2-3次,重悬Fe₃O₄磁珠核于40mMMES缓冲液中,加入活化剂碳二亚胺将Fe₃O₄磁珠核活化;

[0023] 孵育缓冲液由10mM氟化钠溶液、20mM甘油、10mM焦磷酸钠酶抑制剂、30mM亮氨酸酶素溶液、15mM蛋白酶抑制剂和10mM磷酸钾溶液调配制成;以孵育缓冲液为100重量份,10mM氟化钠的含量比例优选2-8重量份范围;20mM甘油的含量比例优选10-35重量份范围;10mM焦磷酸钠酶抑制剂的含量比例优选1-5重量份范围;30mM亮氨酸酶素溶液的含量比例优选1.5-8重量份范围;15mM蛋白酶抑制剂的含量比例优选0.5-2.5重量份范围;余下部分为10mM磷酸钾溶液;

[0024] 洗脱缓冲液由20mM二甲亚砷溶液、15mM苯甲基磺酰氟溶液、10mMNP-40溶液、5mM钒酸钠溶液、10mM抑胰肽酶溶液和10mM磷酸钾溶液调配制成；以洗脱缓冲液为100重量份，20mM二甲亚砷溶液的含量比例优选0.5-10重量份范围；15mM苯甲基磺酰氟溶液的含量比例优选20-30重量份范围；10mMNP-40溶液的含量比例优选5-20重量份范围；5mM钒酸钠溶液的含量比例优选20-35重量份范围；10mM抑胰肽酶溶液的含量比例优选0.5-1.5重量份范围；余下部分为10mM磷酸钾溶液；

[0025] 上样缓冲液由20mM乙酸乙酯溶液、15mMSDS溶液、6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料和15mM氯化钠溶液调配制成；以上样缓冲液为100重量份，20mM乙酸乙酯溶液的含量比例优选25-35重量份范围；15mM SDS溶液的含量比例优选15-45重量份范围；6-联脒-2-苯基吡啶荧光示踪染料含量比例优选0.2-0.8重量份范围；余下部分为15mM氯化钠溶液。

专利名称(译)	一种组蛋白免疫共沉淀 (ChIP) 试剂配方		
公开(公告)号	CN108241055A	公开(公告)日	2018-07-03
申请号	CN2017111467623.X	申请日	2017-12-29
[标]发明人	李旦		
发明人	李旦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/539		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/539		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂配方，其特征在于包括裂解缓冲液、蛋白质交联缓冲液、免疫沉淀磁珠、孵育缓冲液、洗脱缓冲液、上样缓冲液，所述组蛋白免疫共沉淀(ChIP)试剂能够显著降低了实验中抗体链的污染，提高基因检测的准确度。

$$\text{公式一: } Y = \frac{3n^2}{\ln(1+n)} \times 100 \%$$