



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107271656 B

(45)授权公告日 2018.06.01

(21)申请号 201610220212.X

(22)申请日 2016.04.08

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107271656 A

(43)申请公布日 2017.10.20

(73)专利权人 北京爱普拜生物技术有限公司

地址 101111 北京市北京经济技术开发区
经海三路科创六街88号亦庄生物医药
园3号楼701室

(72)发明人 于祥春 冯晓燕 林挺 王文利
龚建

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 101498718 A, 2009.08.05,

CN 1491280 A, 2004.04.21,

袁玉琦等.影响 PVDF膜对蛋白吸附效率的
主要因素.《氨基酸和生物资源》.2015,第37卷
(第3期),

Yee-GuideYeung , E. RichardStanley.A
solution for stripping antibodies from
polyvinylidene fluoride immunoblots for
multiple reprobing.《Analytical
Biochemistry》.2009,第389卷(第1期),

Yee-GuideYeung , E. RichardStanley.A
solution for stripping antibodies from
polyvinylidene fluoride immunoblots for
multiple reprobing.《Analytical
Biochemistry》.2009,第389卷(第1期),

Scott H.Kaufmann et al.The erasable
Western blot.《Analytical Biochemistry》
.1987,第161卷(第1期),

审查员 王在竹

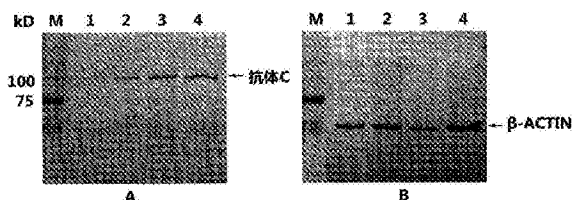
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种蛋白质免疫印迹膜再生液

(57)摘要

本发明属于分子生物学领域,主要涉及到一种蛋白质免疫印迹膜的再生液。此蛋白质免疫印迹膜再生液可以高效去除免疫印迹膜上的一抗和二抗,以便用于蛋白免疫印迹检测中转移了蛋白的同一张印迹膜的重复高效利用,可以非常方便地重新利用使用过的印迹膜检测其它目的蛋白,省时省力,而且可以消除蛋白重新上样而带来的误差,使可比性增强。经过多个抗体的检测实验,这种蛋白质免疫印迹膜再生液通常可以重复利用免疫印迹膜至少三次,大大节省了分子生物学常规实验蛋白质免疫印迹检测所消耗的相关费用,并且使用本试剂只需大约30分钟即可实现蛋白免疫印迹膜的重复再使用。并与底物显色法、化学发光显色、荧光标记二抗的直接检测法兼容。



1. 一种蛋白质免疫印迹膜再生液在蛋白质免疫印迹检测中的应用, 其特征在于, 所述的一种蛋白质免疫印迹膜再生液由1~3M盐酸胍、2~5%SDS、1~10%Tween20组成。
2. 按照权利要求1所述的一种蛋白质免疫印迹膜再生液在蛋白质免疫印迹检测中的应用, 其特征在于, 所述的一种蛋白质免疫印迹膜再生液适用于蛋白质存在的固相支持物硝酸纤维素膜(NC膜)及聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)。

一种蛋白质免疫印迹膜再生液

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质免疫印迹膜再生液,此蛋白质免疫印迹膜再生液可以快速高效充分地去去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗,使蛋白免疫印迹膜可以重复循环使用。

背景技术

[0002] 蛋白质组学 (proteomics) 是指以基因组编码的所有蛋白质为研究对象,从细胞或组织整体水平上研究蛋白质的组成及其变化规律,从而深入认识有机体的各种生理和病理。与传统蛋白质研究比较,蛋白质组学研究体现了全面性、整体性、高通量、大规模的特点。蛋白质组学的研究对于已完成基因组计划的理论预测的蛋白质组进行实证分析具有无法替代的重要作用。蛋白质组学技术较为复杂,包括蛋白质分离、鉴定和信息分析三方面的内容。其中,目的蛋白质的分离鉴定是蛋白质组学的核心技术之一。免疫印迹,又称蛋白质印迹 (Western blot),是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样本中的某种蛋白质的方法。免疫印迹方法首先是使用凝胶电泳分离天然或变性的蛋白质,然后将凝胶中的蛋白质用电印迹方法转移到化学惰性的高分子转移膜上,之后将目的蛋白的特异性一级抗体 (一抗) 与转移膜上的目的蛋白识别并进行免疫结合反应,再用标记过的二级抗体 (二抗) 与一抗结合,之后用对二抗分子中标记物的检测证明目的蛋白的存在及表达量的区别。抗体与抗原能够特异性结合是基于抗原决定簇 (表位) 与抗体超变区的沟槽分子表面的结构互性与亲合性而结合的。是抗原和对应抗体在一定条件下特异结合形成可逆性抗原-抗体复合物的过程。在蛋白印迹检测过程中,除了检测目的蛋白之外,还需要检测 TUBULIN、ACTIN 等表达量相对稳定的蛋白质作为参照以确定蛋白质总上样量的一致性。在通常的蛋白印迹检测过程中,承载了蛋白的印迹膜一次只能做一次免疫印迹检测,无法在同一张膜上同时再对内参蛋白进行检测,如果要进行内参蛋白的检测,只能再进行蛋白电泳转膜等同样的一系列蛋白免疫检测操作,不仅费时费事,还会导致重复上样及操作引起的印迹膜上蛋白状态的变化。因此如果在同一张膜上既可以检测目的蛋白的表达量变化状况,又可以检测 TUBULIN、ACTIN 等表达量相对稳定的参照蛋白或检测其它另外蛋白的状况是最理想的蛋白免疫印迹检测。

[0003] 本发明一种高效蛋白质免疫印迹膜再生液可以在第一次蛋白免疫印迹检测操作全部完成后充分高效地去去除结合在目的蛋白上的一抗和二抗,以此用于蛋白免疫印迹检测中转移了蛋白的同一张印迹膜的重复利用,可以非常简单方便地再次使用印迹膜检测其它目标蛋白,和重新进行 SDS-PAGE 电泳等蛋白免疫印迹操作程序相比,不仅省时省力,并且可以消除蛋白质重新上样及电泳带来的系统误差,在同一张膜上进行内参蛋白与目的蛋白的检测,从而可比性更强。本实用新型经过多个抗体的检测实验,通常可以重复利用印迹膜 2~3 次。而且使用本试剂盒只需大约 30 分钟即可实现蛋白免疫印迹膜的重复使用。

[0004] 参考文献

[0005] 张燕婉等蛋白质免疫印迹技术的实验研究实验技术与管理 2008 (10)

[0006] 赵俊芳等免疫印迹法检测过敏原特异性IgG现代检验医学杂志2008 (01)

发明内容

[0007] 本发明目的之一是提供一种可以简单高效充分去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗的方法；

[0008] 本发明目的之二是提供一种可以简单高效充分去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗的再生液；

[0009] 本发明目的之三是提供一种能够适用于NC膜及PVDF膜上结合的一抗和二抗的再生液；

[0010] 本发明目的之四是提供一种能够适用于蛋白质免疫印迹膜信号检测方法中的底物显色法、化学发光法及荧光标记二抗的直接检测法的可以简单高效充分去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗的再生液；

[0011] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的：

[0012] 针对蛋白的免疫印迹检测(Western blot)中一张膜只能完成一次免疫印迹检测的问题,本发明人进行了深入研究。在抗体和抗原结合的理论基础上,即抗体都是免疫球蛋白而多数抗原也是蛋白质,少数为多糖、类脂、核酸等物质。抗原与抗体反应具有高度的特异性。这一反应是分子表面的结合,虽然相当稳定,但因抗原-抗体本身未受到破坏,它们仍可分离。抗原抗体的结合是分子表面的非共价键结合,形成的复合物是不牢固的,在一定条件下可以解离,因此抗原抗体反应形成复合物的过程是一个动态平衡。抗原抗体复合物解离取决于两方面的因素:一是抗体对应抗原的亲合力;二是环境因素对复合物的影响。因此可以通过破坏抗体对抗原的亲合力,或者改变环境因素中离子强度和pH值破坏离子间静电引力,降低抗原抗体的结合力,促使其解离。因此,鉴于抗体和抗原结合作用的可逆性过程,本发明通过增加抗体和抗原结合环境中的离子强度,即使用增加离子强度和降低反应液中的pH的盐酸胍盐和SDS盐以及Tween 20来促进一抗和抗原的分离,再洗净这些不利于抗体抗原结合的环境因素后,从而进行第二轮的蛋白质免疫印迹检测实验。

附图说明

[0013] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均属于本发明的保护范围内。

[0014] 1.实验材料:

[0015] 1.1小鼠肝组织;

[0016] 1.2抗体

[0017] 兔源多克隆特异抗体A购自美国Abcam公司;

[0018] 兔源多克隆特异抗体B购自美国Abcam公司;

[0019] 鼠源单克隆特异抗体C购自美国Abcam公司;

[0020] 兔源多克隆特异抗体TUBULIN购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0021] 鼠源单克隆特异抗体 β -ACTIN购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0022] 羊源非特异性辣根过氧化物酶标记HRP-Goat-anti-Rabbit二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0023] 羊源非特异性辣根过氧化物酶标记HRP-Goat-anti-Mouse二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0024] 羊源非特异性碱性磷酸酶标记AP-Goat-anti-Rabbit二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0025] 羊源非特异性碱性磷酸酶标记AP-Goat-anti-Mouse二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司;

[0026] 2. 实验试剂:

[0027] Tris盐:北京欣经科生物技术有限责任公司

[0028] DTT(二硫苏糖醇):北京欣经科生物技术有限责任公司

[0029] SDS(十二烷基硫酸钠):MP Biomedicals (Shanghai) Co.,Ltd.

[0030] EDTA-Na₂(乙二胺四乙酸二钠):MP Biomedicals (Shangha) Co.,Ltd.

[0031] 丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺:国药集团化学试剂北京有限公司

[0032] 过硫酸铵:北京欣经科生物技术有限责任公司

[0033] TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺):美国MP Biomedicals公司

[0034] 甘氨酸:国药集团化学试剂北京有限公司

[0035] 预染标准分子量蛋白:美国Biorad公司

[0036] 甲醇:国药集团化学试剂北京有限公司

[0037] 冰醋酸:国药集团化学试剂北京有限公司

[0038] 氯化钠:国药集团化学试剂北京有限公司

[0039] 磷酸二氢钾:国药集团化学试剂北京有限公司

[0040] 磷酸氢二钠:国药集团化学试剂北京有限公司

[0041] 甘油:国药集团化学试剂北京有限公司

[0042] 溴酚蓝:美国MP Biomedicals公司

[0043] Tween-20:美国MP Biomedicals公司

[0044] Bradford蛋白浓度测定试剂:美国Biorad公司

[0045] NBT/BCIP底物显色试剂:生工生物工程(上海)股份有限公司

[0046] ECL-化学发光底物试剂盒:美国伯乐公司

[0047] 3. 实验耗材及仪器:

[0048] 硝酸纤维素膜NC膜孔径0.2 μ m:美国PALL公司

[0049] PALL FluoroTrans PVDF转印膜0.2 μ m:美国PALL公司

[0050] 低温高速离心机:美国Sigma公司

[0051] 蛋白制胶及电泳系统:美国Biorad公司

[0052] 湿式转膜装置:美国Biorad公司

[0053] Las500成像仪器:美国GE公司

[0054] Azure C500成像仪器:美国azure公司

[0055] 4. 主要试剂的配制:

[0056] 4.1 SDS-PAGE电泳

- [0057] 10%APS:称取0.1g过硫酸铵,去离子水溶解并定容至1mL,4℃保存1周内使用。
10%SDS:称取10gSDS,加去离子水定容至100mL。
- [0058] 1.5MTris-HCl (pH8.8):称取18.17g Tris盐,去离子水溶解后,用浓HCl调节pH值至8.8,最后用去离子水定容至100mL,4℃保存。
- [0059] 0.5MTris-HCl (pH6.8):称取6.05g Tris盐,去离子水溶解后,用浓HCl调节pH至6.8,最后用去离子水定容至100mL,4℃保存。
- [0060] 5×蛋白上样缓冲液:0.2g SDS,0.07571g Tris,5mL甘油,0.05g溴酚蓝,0.01DTT,5mL蒸馏水,混匀后用HCl调pH6.8,定容到10mL,分装成1mL小份,-20℃保存。
- [0061] 电泳缓冲液:称取15g Tris盐、72g甘氨酸、5g SDS,去离子水定容至1000mL。
- [0062] 转膜缓冲液:称取3.028g Tris盐,14.414g甘氨酸加入去离子水定容至800mL后,再加入200mL甲醇定容至1000mL。
- [0063] 1×TBS:称取30.2g Tris盐,8.766g氯化钠,加入去离子水定容至1000mL后。
- [0064] 1×TBST:称取30.2g Tris盐,8.766g氯化钠,加入去离子水定容至1000mL后,再加入500μL Tween-20混匀。
- [0065] 4.2蛋白免疫印迹检测
- [0066] 转膜缓冲液:称取3.028g Tris盐,14.414g甘氨酸加入去离子水定容至800mL后,再加入200mL甲醇定容至1000mL。
- [0067] 封闭液:称取5g脱脂奶粉,加入1×TBS定容至100mL。
- [0068] 1×TBST:称取30.2g Tris盐,8.766g氯化钠,加入去离子水定容至1000mL后,再加入500μL Tween-20混匀。
- [0069] 一抗(二抗)反应液:按比例将一抗(二抗)使用1×TBST稀释成反应液。
- [0070] 图1、PVDF膜使用抗体A后的化学发光法检测效果图
- [0071] M为蛋白质分子量标准;1-9泳道为提取的小鼠不同处理肝组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,第一次与一抗A(1:1000稀释度)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Rabbit)反应后,使用化学发光法检测的结果;
- [0072] 图2、PVDF膜使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液洗去抗体后再使用β-ACTIN抗体检测效果图
- [0073] M为蛋白质分子量标准;1-9泳道为提取的小鼠不同处理肝组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,第一次与一抗A(1:1000稀释)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,化学发光法检测后采用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理免疫印迹膜之后,第二次与1:1000稀释的小鼠anti-β-ACTIN及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)的二抗反应后,使用化学发光法检测的结果;
- [0074] 图3、PVDF膜分别使用TUBULIN一抗反应(图3A)和TUBULIN检测结束后再次使用β-ACTIN一抗检测并使用底物显色法检测的效果图(图3B)
- [0075] 图3A、M为蛋白质分子量标准;1-4为提取的小鼠不同组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,第一次与一抗TUBULIN(1:1000稀释度)及碱性磷酸酶(AP)标记的二抗(Goat-anti-Rabbit)(1:1500稀释度)反应后,使用底物显色法检测的结果;
- [0076] 图3B、为图3A的免疫印迹膜采用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理之后,第二次与1:1000稀释的小鼠anti-β-ACTIN及1:1500稀释度的碱性磷酸酶(AP)标记的二抗(Goat-

anti-Mouse)的二抗反应后,使用底物显色法检测的结果;

[0077] 图4、NC膜分别使用抗体B反应(图4A)和检测结束后再次使用 β -ACTIN一抗检测并使用化学法检测的效果图(图4B)

[0078] 图4A、M为蛋白质分子量标准;1-4为提取的小鼠不同组织的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,第一次与抗体B(1:1000稀释度)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Goat-anti-Rabbit)(1:5000稀释度)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0079] 图4B、为图4A的免疫印迹膜采用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理之后,第二次与1:1000稀释的小鼠anti- β -ACTIN及1:5000稀释度的辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Goat-anti-Mouse)的二抗反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0080] 图5、NC膜分别使用抗体C反应(图5A)和抗体C反应后再次使用 β -ACTIN抗体检测使用底物显色法检测的效果图(图5B)

[0081] 图5A、M为蛋白质分子量标准;1-4为提取的不同处理的小鼠肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,第一次与一抗C(1:1000稀释度)及碱性磷酸酶(AP)标记的二抗(Goat-anti-Mouse)(1:1500稀释度)反应后,使用底物显色法检测的结果;

[0082] 图5B、为图6A的免疫印迹膜采用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理之后,第二次与1:1000稀释的小鼠anti- β -ACTIN及1:1500稀释度的碱性磷酸酶(AP)标记的(Goat-anti-Mouse)的二抗反应后,使用底物显色法检测的结果;

[0083] 图6、PVDF膜分别使用抗体B反应(图6A)和检测结束后再次使用 β -ACTIN一抗并使用荧光标记的二抗反应结束后直接检测的效果图(图6B)

[0084] 图6A、M为蛋白质分子量标准;1-4为提取的小鼠不同组织的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,第一次与抗体B(1:1000稀释度)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Goat-anti-Rabbit)(1:5000稀释度)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0085] 图6B、为图6A的免疫印迹膜采用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理之后,第二次与1:1000稀释的小鼠anti- β -ACTIN及1:8000稀释度的Dylight800标记的二抗(Goat-anti-Mouse)的二抗反应后,使用成像仪器直接检测的结果;

具体实施方式

[0086] 实施例1使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理PVDF膜并结合化学发光法检测免疫印迹膜的结果

[0087] 1、实验方法

[0088] (1) 小鼠肝组织按照100mg动物组织加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并匀浆处理;

[0089] (2) 冰上孵育45分钟;

[0090] (3) 4 $^{\circ}$ C,13000rpm离心30分钟;

[0091] (4) 收集的上清即为动物总蛋白提取物,可以进行后续实验操作。

[0092] (5) 取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5 \times loadingbuffer充分混合均匀后,100 $^{\circ}$ C加热煮沸5分钟后放置为室温后4 $^{\circ}$ C,13000rpm离心20分钟并吸取上清备用。

[0093] (6) 蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0094] (7) 将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0095] (8) 配制10%的聚丙烯酰胺分离胶混合液,聚丙烯酰胺凝分离胶混合液的组成为30%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、1.5MTris-Cl (pH8.8)、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED。取一定量的上述溶液或试剂混合均匀后全量加样于玻璃板中,并缓慢加入去离子水为封水层,室温下放置30min等待分离胶凝固。

[0096] (9) 待分离胶凝固后倒掉所封水层,加入2mL聚丙烯酰胺浓缩胶,同时在胶面上插上梳子。

[0097] (10) 待浓缩胶凝固后,缓慢拔掉梳子,加样于上样孔中,80V电压跑电泳,待样品在浓缩胶和分离胶的界面处压成一条线时,调电压至150V。

[0098] (11) 电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0099] (12) 转膜:将转膜用的夹子(夹子的黑色部分在最下方)按照海绵-Whatman滤纸-胶-PVDF膜-Whatman滤纸-海绵-透明夹子部分夹好后,用BioRad湿式转膜装置进行转膜操作,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0100] (13) 封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0101] (14) 一抗孵育:加入一抗(抗体A):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0102] (15) 洗膜:TBST (TBS+0.1%Tween 20) 洗5次,每次5min;

[0103] (16) 二抗孵育:加入二抗 (HRP-Goat-anti-Rabbit), 稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0104] (17) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0105] (18) 显色:采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0106] (19) 免疫印迹膜再生:二抗反应后加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟;

[0107] (20) 再封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0108] (21) 一抗孵育:加入一抗(β -ACTIN) 稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0109] (22) 洗膜:TBST (TBS+0.1%Tween 20) 洗5次,每次5min;

[0110] (23) 二抗孵育:加入二抗 (HRP-Goat-anti-Mouse), 稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0111] (24) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0112] (25) 显色:采用化学底物发光试剂盒并使用Las500成像仪器进行免疫印迹膜的显色观察。

[0113] 2、实验结果

[0114] 实验结果显示,第一次使用目的蛋白抗体A进行蛋白质免疫印迹检测后,结果显示抗体A对抗原的识别性不具有显著特异性(图1)。加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟,去除抗体A对抗原的结合后,再进行第二次 β -ACTIN目标蛋白的免疫印迹检测,结果显示去除抗体A后进行第二次的 β -ACTIN检测信号强,背景信噪比很低(图2)。由此说明,高效蛋白质免疫印迹膜再生液可以高效去除非特异性抗体和抗原的结合,不影响第二次免疫印迹检测,并且第二次检测效果良好。

[0115] 实施例2使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理PVDF膜并结合底物显色法检测免疫印迹膜的结果

[0116] 1、实验方法

[0117] (1) 小鼠肝组织按照100mg动物组织加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并匀浆处理；

[0118] (2) 冰上孵育45分钟；

[0119] (3) 4℃, 13000rpm离心30分钟；

[0120] (4) 收集的上清即为动物总蛋白提取物, 可以进行后续实验操作。

[0121] (5) 取24μL提取出的蛋白质溶液, 加入6μL的5×loading buffer充分混合均匀后, 100℃加热煮沸5分钟后放置为室温后4℃, 13000rpm离心20分钟并吸取上清备用。

[0122] (6) 蛋白浓度的测定: 采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0123] (7) 将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0124] (8) 配制10%的聚丙烯酰胺分离胶混合液, 聚丙烯酰胺凝分离胶混合液的组成为30%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、1.5M Tris-Cl (pH8.8)、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED。取一定量的上述溶液或试剂混合均匀后全量加样于玻璃板中, 并缓慢加入去离子水为封水层, 室温下放置30min等待分离胶凝固。

[0125] (9) 待分离胶凝固后倒掉所封水层, 加入2mL聚丙烯酰胺浓缩胶, 同时在胶面上插上梳子。

[0126] (10) 待浓缩胶凝固后, 缓慢拔掉梳子, 加样于上样孔中, 80V电压跑电泳, 待样品在浓缩胶和分离胶的界面处压成一条线时, 调电压至150V。

[0127] (11) 电泳结束后, 分开两块玻璃板, 切除浓缩胶。

[0128] (12) 转膜: 将转膜用的夹子(夹子的黑色部分在最下方)按照海绵-Whatman滤纸-胶-PVDF膜-Whatman滤纸-海绵-透明夹子部分夹好后, 用Bio-Rad湿式转膜装置进行转膜操作, 加入转膜缓冲液(恒流: 400mA)转2个小时；

[0129] (13) 封闭: 用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭, 室温下反应2小时；

[0130] (14) 一抗孵育: 加入一抗(Anti-TUBULIN): 稀释比例为1:1000, 室温反应2小时；

[0131] (15) 洗膜: TBST (TBS+0.1% Tween 20) 洗5次, 每次5min；

[0132] (16) 二抗孵育: 加入碱性磷酸酶标记的二抗(AP-Goat-anti-Rabbit), 稀释比例为1:1500, 室温反应1-2小时；

[0133] (17) 洗膜: TBST洗5次, 每次5min。

[0134] (18) 显色: 采用碱性磷酸酶底物NBT/BCIP试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0135] (19) 免疫印迹膜再生: 二抗反应后加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次, 每次5分钟；

[0136] (20) 再封闭: 用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭, 室温下反应2小时；

[0137] (21) 一抗孵育: 加入一抗(β-ACTIN) 稀释比例为1:1000, 室温反应2小时；

[0138] (22) 洗膜: TBST (TBS+0.1% Tween 20) 洗5次, 每次5min；

[0139] (23) 二抗孵育: 加入碱性磷酸酶标记的二抗(AP-Goat-anti-Mouse), 稀释比例为1:1500, 室温反应1-2小时；

[0140] (24) 洗膜: TBST洗5次, 每次5min。

[0141] (25) 显色: 采用碱性磷酸酶底物NBT/BCIP试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0142] 2、实验结果

[0143] 实验结果显示,第一次使用目的蛋白TUBULIN的抗体进行蛋白质免疫印迹检测并使用底物显色法进行显色反应后,TUBULIN的抗体对抗原的识别效果佳(图3A)。检测之后,加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟,去除抗原抗体的结合后,再进行第二次 β -ACTIN目标蛋白的免疫印迹检测,结果显示 β -ACTIN检测信号清晰且强度大(图3B),由此说明高效蛋白质免疫印迹膜再生液同样适用于底物显色法进行的蛋白免疫印迹检测。

[0144] 实施例3使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理NC膜并结合化学发光法检测免疫印迹膜的结果

[0145] 实验方法

[0146] (1) 小鼠肝组织按照100mg动物组织加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并匀浆处理;

[0147] (2) 冰上孵育45分钟;

[0148] (3) 4℃,13000rpm离心30分钟;

[0149] (4) 收集的上清即为动物总蛋白提取物,可以进行后续实验操作。

[0150] (5) 取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5×loading buffer充分混合均匀后,100℃加热煮沸5分钟后放置为室温后4℃,13000rpm离心20分钟并吸取上清备用。

[0151] (6) 蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0152] (7) 将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0153] (8) 配制10%的聚丙烯酰胺分离胶混合液,聚丙烯酰胺凝分离胶混合液的组成为30%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、1.5M Tris-Cl (pH8.8)、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED。取一定量的上述溶液或试剂混合均匀后全量加样于玻璃板中,并缓慢加入去离子水为封水层,室温下放置30min等待分离胶凝固。

[0154] (9) 待分离胶凝固后倒掉所封水层,加入2mL聚丙烯酰胺浓缩胶,同时在胶面上插上梳子。

[0155] (10) 待浓缩胶凝固后,缓慢拔掉梳子,加样于上样孔中,80V电压跑电泳,待样品在浓缩胶和分离胶的界面处压成一条线时,调电压至150V。

[0156] (11) 电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0157] (12) 转膜:将转膜用的夹子(夹子的黑色部分在最下方)按照海绵-Whatman滤纸-胶-NC膜-Whatman滤纸-海绵-透明夹子部分夹好后,用Bio-Rad湿式转膜装置进行转膜操作,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0158] (13) 封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0159] (14) 一抗孵育:加入一抗(抗体B):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0160] (15) 洗膜:TBST (TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0161] (16) 二抗孵育:加入二抗(HRP-Goat-anti-Rabbit),稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0162] (17) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0163] (18) 显色:采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0164] (19) 免疫印迹膜再生:二抗反应后加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟

后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟;

[0165] (20) 封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0166] (21) 一抗孵育:加入 β -ACTIN稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0167] (22) 洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0168] (23) 二抗孵育:加入二抗(HRP-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0169] (24) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0170] (25) 显色:采用化学底物发光试剂盒及Las500成像仪器进行免疫印迹膜的显色观察。

[0171] 2、实验结果

[0172] 实验结果显示,将蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上后第一次使用目的蛋白抗体B进行蛋白质免疫印迹检测后,结果显示抗体B对抗原的识别性具有显著特异性(图4A)。加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟,去除抗体B对抗原的结合后,再进行第二次 β -ACTIN目标蛋白的免疫印迹检测,结果显示去除抗体B后进行第二次的 β -ACTIN检测信号强,背景信噪比很低(图4B),此结果说明高效蛋白质免疫印迹膜再生液同样也适用于NC膜的再次免疫印迹检测。

[0173] 实施例4使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理NC膜并结合底物显色法检测免疫印迹膜的结果

[0174] 实验方法

[0175] (1) 小鼠肝组织按照100mg动物组织加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并匀浆处理;

[0176] (2) 冰上孵育45分钟;

[0177] (3) 4℃,13000rpm离心30分钟;

[0178] (4) 收集的上清即为动物总蛋白提取物,可以进行后续实验操作。

[0179] (5) 取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5×loading buffer充分混合均匀后,100℃加热煮沸5分钟后放置为室温后4℃,13000rpm离心20分钟并吸取上清备用。

[0180] (6) 蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0181] (7) 将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0182] (8) 配制10%的聚丙烯酰胺分离胶混合液,聚丙烯酰胺凝分离胶混合液的组成为30%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、1.5M Tris-Cl(pH8.8)、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED。取一定量的上述溶液或试剂混合均匀后全量加样于玻璃板中,并缓慢加入去离子水为封水层,室温下放置30min等待分离胶凝固。

[0183] (9) 待分离胶凝固后倒掉所封水层,加入2mL聚丙烯酰胺浓缩胶,同时在胶面上插上梳子。

[0184] (10) 待浓缩胶凝固后,缓慢拔掉梳子,加样于上样孔中,80V电压跑电泳,待样品在浓缩胶和分离胶的界面处压成一条线时,调电压至150V。

[0185] (11) 电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0186] (12) 转膜:将转膜用的夹子(夹子的黑色部分在最下方)按照海绵-Whatman滤纸-胶-NC膜-Whatman滤纸-海绵-透明夹子部分夹好后,用Bio-Rad湿式转膜装置进行转膜操

作,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0187] (13) 封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0188] (14) 一抗孵育:加入一抗C,稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0189] (15) 洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0190] (16) 二抗孵育:加入二抗(AP-Goat-anti-Rabbit),稀释比例为1:1500,室温反应1-2小时;

[0191] (17) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0192] (18) 显色:采用碱性磷酸酶底物试剂盒NBT/BCIP进行免疫印迹膜的显色观察。

[0193] (19) 免疫印迹膜再生:二抗反应后加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟;

[0194] (20) 再封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0195] (21) 一抗孵育:加入一抗 β -ACTIN,稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0196] (22) 洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0197] (23) 二抗孵育:加入碱性磷酸酶标记的二抗(AP-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:1500,室温反应1-2小时;

[0198] (24) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0199] (25) 显色:采用碱性磷酸酶底物试剂盒NBT/BCIP进行免疫印迹膜的显色观察。

[0200] 实验结果

[0201] 实验结果显示,将蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上后第一次使用抗体C进行蛋白质免疫印迹检测并使用底物显色法进行显色反应后,结果显示一抗C对抗原的识别效果佳(图5A)。第一次检测之后,加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟,去除抗原抗体的结合后,再进行第二次 β -ACTIN目标蛋白的免疫印迹检测,结果显示 β -ACTIN检测信号强(图5B),说明高效蛋白质免疫印迹膜再生液同样适用于NC膜上的底物显色法进行的蛋白免疫印迹检测。

[0202] 实施例5使用高效蛋白质免疫印迹膜再生液处理PVDF膜并结合仪器直接检测免疫印迹膜的结果

[0203] 1、实验方法

[0204] (1) 小鼠肝组织按照100mg动物组织加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并匀浆处理;

[0205] (2) 冰上孵育45分钟;

[0206] (3) 4℃,13000rpm离心30分钟;

[0207] (4) 收集的上清即为动物总蛋白提取物,可以进行后续实验操作。

[0208] (5) 取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5×loading buffer充分混合均匀后,100℃加热煮沸5分钟后放置为室温后4℃,13000rpm离心20分钟并吸取上清备用。

[0209] (6) 蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0210] (7) 将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0211] (8) 配制10%的聚丙烯酰胺分离胶混合液,聚丙烯酰胺凝分离胶混合液的组成为30%丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺、1.5M Tris-Cl(pH8.8)、10%SDS、10%过硫酸铵、TEMED。取一

定量的上述溶液或试剂混合均匀后全量加样于玻璃板中,并缓慢加入去离子水为封水层,室温下放置30min等待分离胶凝固。

[0212] (9) 待分离胶凝固后倒掉所封水层,加入2mL聚丙烯酰胺浓缩胶,同时在胶面上插上梳子。

[0213] (10) 待浓缩胶凝固后,缓慢拔掉梳子,加样于上样孔中,80V电压跑电泳,待样品在浓缩胶和分离胶的界面处压成一条线时,调电压至150V。

[0214] (11) 电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0215] (12) 转膜:将转膜用的夹子(夹子的黑色部分在最下方)按照海绵-Whatman滤纸-胶-PVDF膜-Whatman滤纸-海绵-透明夹子部分夹好后,用BioRad湿式转膜装置进行转膜操作,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0216] (13) 封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0217] (14) 一抗孵育:加入一抗(抗体D):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0218] (15) 洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0219] (16) 二抗孵育:加入二抗(HRP-Goat-anti-Rabbit),稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0220] (17) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0221] (18) 显色:采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0222] (19) 免疫印迹膜再生:二抗反应后加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟;

[0223] (20) 再封闭:用5%的脱脂奶粉(使用TBS配置)封闭液进行封闭,室温下反应2小时;

[0224] (21) 一抗孵育:加入一抗(β -ACTIN)稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0225] (22) 洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0226] (23) 二抗孵育:加入荧光标记的二抗(Dylight800-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:8000,室温反应1-2小时;

[0227] (24) 洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0228] (25) 显色:采用azure成像仪器直接进行免疫印迹膜的显色观察。

[0229] 2、实验结果

[0230] 实验结果显示,第一次使用目的蛋白的抗体D进行蛋白质免疫印迹检测并使用底物显色法进行显色反应后,抗体D对抗原的识别效果佳(图6A)。检测之后,加入高效蛋白质免疫印迹膜再生液反应20分钟后使用1×TBS洗涤2次,每次5分钟,去除抗原抗体的结合后,再进行第二次 β -ACTIN目标蛋白的免疫印迹检测,结果显示 β -ACTIN检测信号清晰且强度大(图6B),由此说明高效蛋白质免疫印迹膜再生液同样适用于荧光标记的二抗的直接蛋白免疫印迹膜的检测。

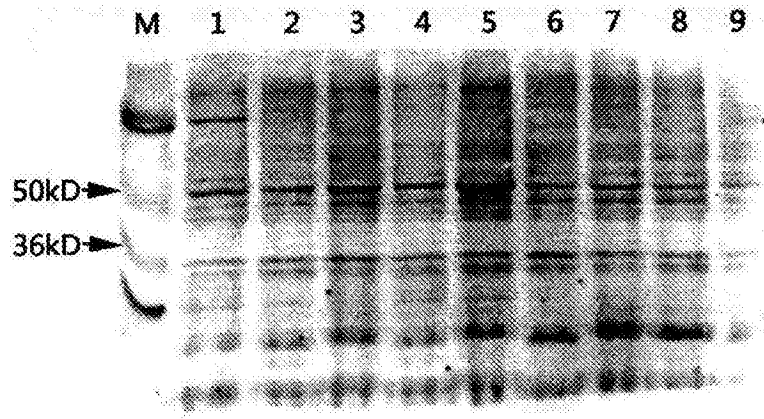


图1

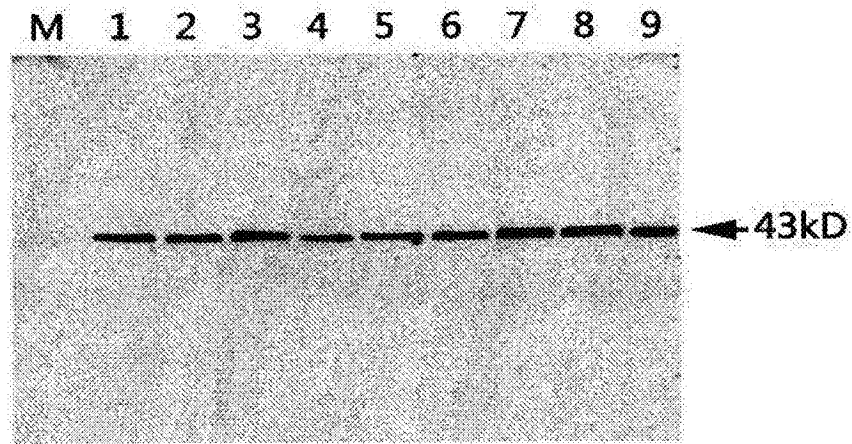


图2

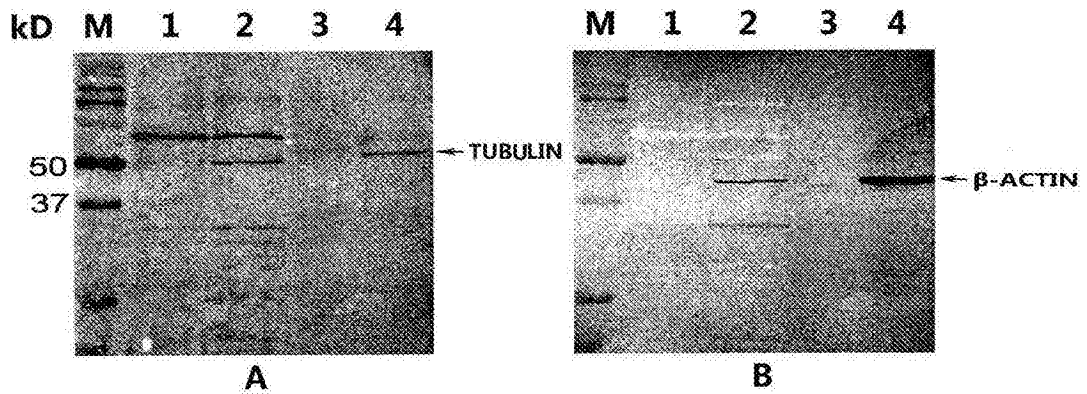


图3

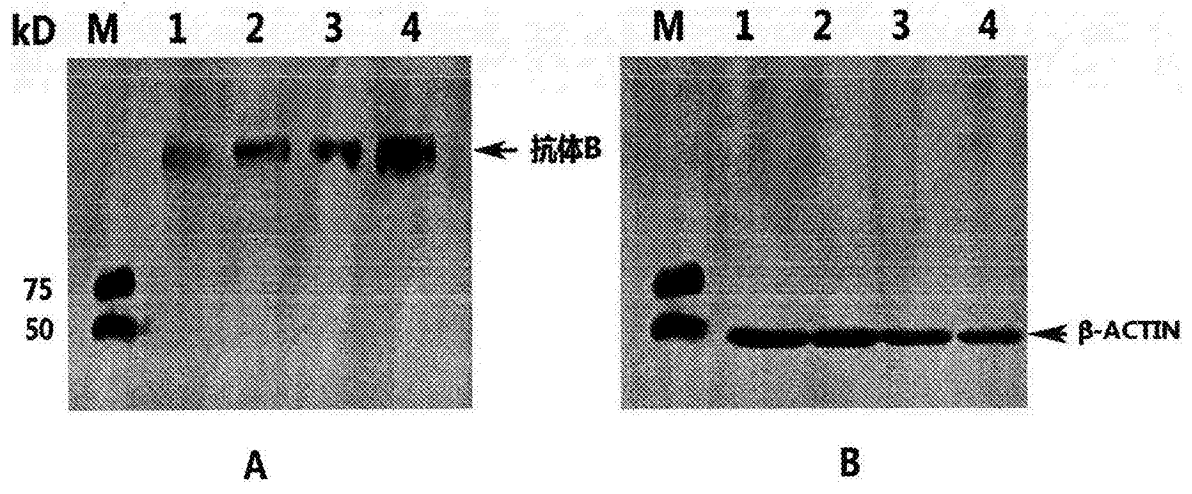


图4

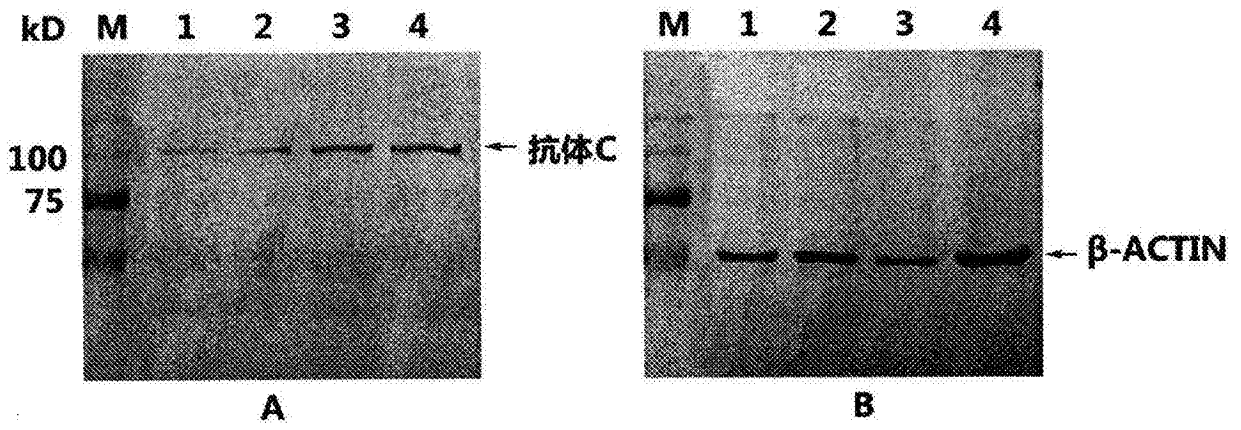


图5

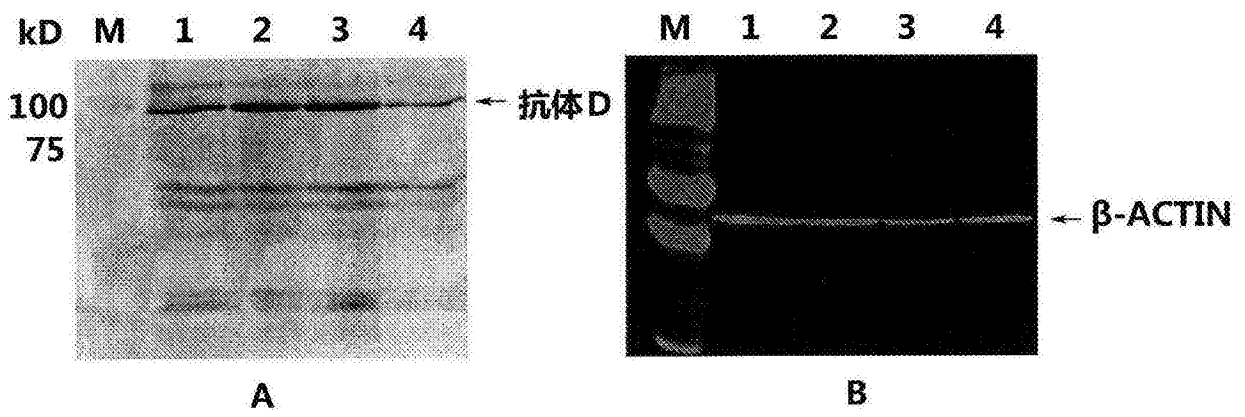


图6

专利名称(译)	一种蛋白质免疫印迹膜再生液		
公开(公告)号	CN107271656B	公开(公告)日	2018-06-01
申请号	CN201610220212.X	申请日	2016-04-08
[标]发明人	于祥春 冯晓燕 林挺 王文利 龚建		
发明人	于祥春 冯晓燕 林挺 王文利 龚建		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
其他公开文献	CN107271656A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于分子生物学领域，主要涉及到一种蛋白质免疫印迹膜的再生液。此蛋白质免疫印迹膜再生液可以高效去除免疫印迹膜上的一抗和二抗，以便用于蛋白免疫印迹检测中转移了蛋白的同一张印迹膜的重复高效利用，可以非常方便地重新利用使用过的印迹膜检测其它目的蛋白，省时省力，而且可以消除蛋白重新上样而带来的误差，使可比性增强。经过多个抗体的检测实验，这种蛋白质免疫印迹膜再生液通常可以重复利用免疫印迹膜至少三次，大大节省了分子生物学常规实验蛋白质免疫印迹检测所消耗的相关费用，并且使用本试剂只需大约30分钟即可实现蛋白免疫印迹膜的重复再使用。并与底物显色法、化学发光显色、荧光标记二抗的直接检测法兼容。

