



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107271657 A

(43)申请公布日 2017. 10. 20

(21)申请号 201610220215.3

(22)申请日 2016.04.08

(71)申请人 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)

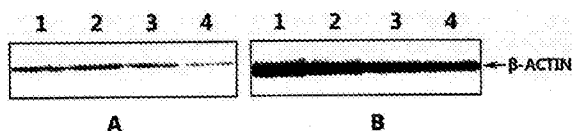
权利要求书1页 说明书11页 附图2页

(54)发明名称

一种蛋白质免疫印迹信号增强剂

(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信号增强剂。此增强剂能将蛋白质免疫印迹检测中的信号强度和灵敏度平均提高3~10倍,显著降低背景。此增强剂使用方法简单,并可用于PVDF膜或硝酸纤维素膜,并与底物显色法、化学发光显色法及荧光显色法兼容。



1. 一种蛋白质免疫印迹信号增强剂。
2. 按照权利要求1所述的用途,其特征在于,一种可以显著增强蛋白质免疫印迹信号的增强剂。
3. 按照权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的一种可以显著增强蛋白质免疫印迹检测信号的增强剂适用于蛋白质存在的固相支持物上的信号增强作用。
4. 按照权利要求3所述的用途,其特征在于,所述的一种可以显著增强蛋白质免疫印迹检测信号的增强剂适用于蛋白质存在的固相支持主要包括硝酸纤维素膜(NC膜)及聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)。
5. 按照权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的一种可以显著增强蛋白质免疫印迹信号的增强剂适用于从各种生物样本中提取的蛋白质的免疫印迹信号的增强作用。
6. 按照权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的一种可以显著增强蛋白质免疫印迹检测信号的增强剂适用于蛋白质免疫印迹操作过程中底物显色、化学发光及荧光标记二抗的直接检测方法。
7. 按照权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的一种可以显著增强蛋白质免疫印迹信号的增强剂使用于蛋白质免疫印迹检测过程中的封闭前使用。
8. 按照权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的一种高效蛋白质免疫印迹检测的信号增强剂由A液和B液2个部分组成。
9. 按照权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的一种高效蛋白质免疫印迹检测的信号增强剂A液组成成分及浓度分别为:0.2~1M甘氨酸(pH3.0),信号增强剂B液组成成分及浓度分别为:5~10%SDS,50%Tween20。
10. 按照权利要求8所述的用途,其特征在于,所述的一种蛋白质免疫印迹检测的信号增强剂A液和B液的使用比例为1:1~3:1。

一种蛋白质免疫印迹信号增强剂

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及一种蛋白质免疫印迹检测的信号增强剂,此蛋白质免疫印迹信号增强剂可以显著增加蛋白质免疫印迹检测过程中的信号强度。

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,凝胶电泳是分离和鉴定蛋白质的核心技术之一。蛋白质免疫印迹检测技术是继凝胶电泳后的蛋白质组学研究技术之一,其主要是用来识别、量化、并确定特定蛋白的大小。蛋白质免疫印记技术是由Northern blot和Southern blot演化而来,被称作Western blot。Western blot的方法首先是使用凝胶电泳分离天然或变性的蛋白质,然后将蛋白质转移到固体承载物上,之后用未标记的或已标记的特异性一抗与转移到固体承载物上的抗原识别并结合,再加入二抗(二抗上标记有酶、荧光、生物素等基团)对结合抗原的一抗进行识别放大免疫信号,最后针对一抗或者二抗上偶联的探针基团(探针种类主要有酶、荧光基团和生物素,蛋白质免疫印迹检测中常使用到的探针种类包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、荧光标记三种)并具有相对应的检测方法。想要完成一次成功的Western blot操作并非易事,主要原因包括目的蛋白丰度低、抗体亲和力弱、表位难以识别等等诸多问题。因此,如何增强免疫印迹膜上的目的蛋白的信号强度是非常重要的以及亟待解决的技术问题。

发明内容

[0003] 本发明目的之一是提供一种能够显著增强蛋白质免疫印迹膜上目标蛋白信号的方法;

[0004] 本发明目的之二是提供一种能够适用于不同载体材料上目标蛋白信号的增强剂;

[0005] 本发明目的之三是提供一种能够适用于多种显色方法的蛋白质免疫印迹膜上目标蛋白信号的增强剂;

[0006] 本发明目的之四是提供一种可适用于从多种生物样本中提取的蛋白质的免疫印迹检测过程中的信号的增强作用。

[0007] 本发明的上述目的是通过以下技术方案来实现的:

[0008] 针对蛋白的免疫印迹检测(Western blot)中抗体亲和力弱、表位难以识别等等诸多问题,本发明人进行了深入研究,并经过长期,反复多次试验,首先发现蛋白免疫印迹检测中经常使用到的固相支持物,主要包括硝酸纤维素膜和聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)两种都是属于海绵状的多孔结构物质,蛋白质转移到这些固相支持膜上面后,有许多蛋白不仅是

存在于膜的表面而是进入到孔洞中隐藏起来,因此造成免疫印迹膜上的蛋白难以被一抗识别及结合的现象,一抗的识别及结合少就会导致二抗结合量的减少从而产生免疫信号弱的现象。针对这个现象,我们使用高浓度低pH的甘氨酸溶液可以有效迅速剥离膜支持膜表面的细微的一层干性保护膜,使得藏在支持膜孔洞内更多的蛋白质外露并被一抗识别来增加免疫信号的强度。因此在不同的免疫印迹检测操作的过程中封闭前和二抗反应后都可以采用这种方法增强目的蛋白的免疫信号。此外,由于Tween 20是一种离子表面活性剂,高浓度的Tween20和适量的SDS在低pH的情况下,可以使支持膜上的大多数蛋白质充分变性,使抗原暴露出更多的抗原表位,从而使一抗更加容易接近抗原表位。同时,高浓度的Tween20还可以减少抗原和抗体的非特异性结合,降低了免疫印迹膜的背景,更进一步地增加了免疫印迹膜上蛋白信号的强度。

附图说明

[0009] 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。

[0010] 1.实验材料:

[0011] 1.1小鼠肝组织、水稻、玉米、大豆、小麦的叶片组织;

[0012] 1.2抗体

[0013] 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;

[0014] 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;

[0015] 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;

[0016] 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;

[0017] 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;

[0018] 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;

[0019] 2.实验试剂:

[0020] Tris盐:北京欣经科生物技术有限责任公司

[0021] DTT(二硫苏糖醇):北京欣经科生物技术有限责任公司

[0022] SDS(十二烷基硫酸钠):MP Biomedicals(Shanghai)Co.,Ltd.

[0023] EDTA- Na_2 (乙二胺四乙酸二钠):MP Biomedicals(Shangha)Co.,Ltd.

[0024] 丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺:国药集团化学试剂北京有限公司

[0025] 过硫酸铵:北京欣经科生物技术有限责任公司

[0026] TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺):美国MP Biomedicals公司

[0027] 甘氨酸:国药集团化学试剂北京有限公司

[0028] 预染标准分子量蛋白:美国Biorad公司

- [0029] 甲醇:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0030] 冰醋酸:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0031] 氯化钠:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0032] 磷酸二氢钾:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0033] 磷酸氢二钠:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0034] 甘油:国药集团化学试剂北京有限公司
- [0035] 溴酚蓝:美国MP Biomedicals公司
- [0036] Bradford蛋白浓度测定试剂:美国Biorad公司
- [0037] Tween-20:美国MP Biomedicals公司
- [0038] NBT/BCIP底物显色试剂:生工生物工程(上海)股份有限公司
- [0039] ECL-化学发光底物试剂盒:美国伯乐公司
- [0040] 3.实验耗材及仪器:
- [0041] 硝酸纤维素膜NC膜孔径0.2 μ m:美国PALL公司
- [0042] PALL FluoroTrans PVDF转印膜0.2 μ m:美国PALL公司
- [0043] 低温高速离心机:美国Sigma公司
- [0044] 蛋白制胶及电泳系统:美国Biorad公司
- [0045] 湿式转膜装置:美国Biorad公司
- [0046] Las500成像仪器:美国GE公司
- [0047] Azure C500成像仪器:美国azure公司
- [0048] 4.主要试剂的配制:
- [0049] 4.1SDS-PAGE电泳
- [0050] 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。
- [0051] 1.5MTris-HCl(pH8.8):称取18.17gTris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。
- [0052] 0.5M Tris-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。
- [0053] 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。
- [0054] 电泳缓冲液:称取15g Tris盐、72g甘氨酸、5g SDS,去离子水定容至1000mL。
- [0055] 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。
- [0056] 1×TBS:称取30.2g Tris盐,8.766g氯化钠,加入去离子水定容至1000mL后。
- [0057] 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500 μ L Tween-20混匀。
- [0058] 4.2蛋白免疫印迹检测
- [0059] 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。
- [0060] 封闭液:称取5g脱脂奶粉,加入1×TBS定容至100mL。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 图1、PVDF膜封闭前使用蛋白质免疫印迹信号增强剂前后并使用化学发光法检测的效果比对图

[0064] 图1A、PVDF膜未使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0065] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转膜封闭后与一抗β-ACTIN(1:1000稀释度)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0066] 图1B、PVDF膜封闭前使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0067] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转PVDF膜后将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理。再与一抗β-ACTIN(1:1000稀释度)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0068] 图2、硝酸纤维素膜封闭前使用蛋白质免疫印迹信号增强剂前后并使用化学发光法检测的效果比对图

[0069] 图2A、硝酸纤维素膜未使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0070] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转硝酸纤维素膜(NC膜)封闭后与一抗β-ACTIN(1:1000稀释度)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0071] 图2B、硝酸纤维素膜使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0072] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转硝酸纤维素膜(NC膜)后将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理与一抗β-ACTIN(1:1000稀释度)及1:5000稀释度的HRP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用化学发光法检测的结果;

[0073] 图3、PVDF膜使用蛋转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用碱性磷酸酶底物显色法检测的效果比对图

[0074] 图3A、PVDF膜未使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的免疫印迹检测效果图

[0075] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转PVDF膜后与一抗β-ACTIN(1:1000稀释度)及1:1500稀释度的AP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用碱性磷酸酶底物显色法检测的结果;

[0076] 图3B、PVDF膜使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0077] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50μg,转PVDF膜后将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理。再与一抗β-ACTIN(1:1000)稀释度)

及1:1500稀释度的AP标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用碱性磷酸酶底物显色法检测的结果;

[0078] 图4、PVDF膜转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用荧光标记二抗直接检测法的效果比对图

[0079] 图4A、PVDF膜未使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹荧光显色法检测效果图

[0080] M为蛋白质分子量标准;14泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,与一抗 β -ACTIN(1:1000稀释度)及1:8000稀释度的Dylight800标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用仪器直接观察荧光显色法检测的结果;

[0081] 图4B、PVDF膜使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0082] M为蛋白质分子量标准;1-4泳道为提取的小鼠不同处理肺组织的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,转PVDF膜后将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理。再与一抗 β -ACTIN(1:1000稀释度)及1:8000稀释度的Dylight800标记的二抗(Goat-anti-Mouse)反应后,使用仪器直接观察荧光显色法检测的结果;

[0083] 图5、植物类蛋白电泳后转PVDF膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用化学发光法检测的效果比对图

[0084] 图5A、植物蛋白转PVDF膜后未使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0085] M为蛋白质分子量标准;1-8泳道分别为水稻、玉米、大豆、小麦、大麦、烟草、番茄、泡桐的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,与一抗TUBULIN(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;

[0086] 图5B、植物蛋白转PVDF膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂的蛋白质免疫印迹检测效果图

[0087] M为蛋白质分子量标准;1-8泳道分别为水稻、玉米、大豆、小麦、大麦、烟草、番茄、泡桐的全蛋白,蛋白上样量均为50 μ g,转PVDF膜后封闭前使用蛋白质免疫印迹信号增强剂后与一抗TUBULIN(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;

具体实施方式

[0088] 实施例1

[0089] 1、实验方法

[0090] (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。

[0091] (2)冰上孵育45分钟。

[0092] (3)4 $^{\circ}$ C,13000rpm离心30分钟。

[0093] (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。

[0094] (5)取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5 $\times$ loading buffer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。

[0095] (6)蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0096] (7)将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0097] (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。

[0098] (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。

[0100] (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。

[0101] (11)电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0102] (12)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:将整个装置放置于大的冰盒中,同时转两张膜,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0103] (13)转膜完成后一张膜使用去离子水冲净膜后,将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理;另一张膜直接进行封闭操作;

[0104] (14)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;

[0105] (15)加入一抗(小鼠 β -ACTIN):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0106] (16)洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0107] (17)加入二抗(HRP-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0108] (18)洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0109] (19)采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0110] 2、实验结果

[0111] 实验结果显示,封闭前经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理的印迹膜的信号强度(图1B)显著高于未经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理过的印迹膜(图1A),信号增强倍数平均为4倍(表1)。

[0112] 实施例2

[0113] (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。

[0114] (2)冰上孵育45分钟。

[0115] (3)4℃,13000rpm离心30分钟。

[0116] (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。

[0117] (5)取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5 $\times$ 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。

[0118] (6)蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0119] (7)将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0120] (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。

[0121] (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。

[0122] (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。

[0123] (11)电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0124] (12)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-硝酸纤维素膜-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:将整个装置放置于大的冰盒中,同时转两张膜,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0125] (13)转膜完成后一张膜使用去离子水冲净膜后,将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理;另一张膜直接进行封闭操作;

[0126] (14)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;

[0127] (15)加入一抗(小鼠 β -ACTIN):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0128] (16)洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0129] (17)加入二抗(HRP-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:5000,室温反应1-2小时;

[0130] (18)洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0131] (19)采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0132] 2、实验结果

[0133] 实验结果显示,使用硝酸纤维素膜进行实验操作,封闭前经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理的印迹膜的信号强度(图3B)显著高于未经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理过的印迹膜(图3A),信号增强倍数平均为1.7~3.8倍(表3)。

[0134] 实施例3

[0135] 1、实验方法

[0136] (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;

[0137] (2)冰上孵育45分钟;

[0138] (3)4℃,13000rpm离心30分钟;

[0139] (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。

[0140] (5)取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5 $\times$ 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。

[0141] (6)蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0142] (7)将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0143] (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。

[0144] (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。

[0145] (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。

[0146] (11)电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0147] (12)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:将整个装置放置于大的冰盒中,同时转两张膜,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0148] (13)转膜完成后一张膜使用去离子水冲净膜后,将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理;另一张膜直接进行封闭操作;

[0149] (14)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;

[0150] (15)加入一抗(小鼠 β -ACTIN):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0151] (16)洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0152] (17)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2小时;

[0153] (18)洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0154] (19)采用碱性磷酸酶底物显色试剂进行免疫印迹膜的显色观察并照相。

[0155] 2、实验结果

[0156] 实验结果显示,封闭之前经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理的PVDF印迹膜采用碱性磷酸酶底物显色法的信号强度(图4B)显著高于未经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理过的印迹膜(图4A),信号增强倍数平均为23~73倍(表4)。

[0157] 实施例4

[0158] (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;

[0159] (2)冰上孵育45分钟;

[0160] (3)4℃,13000rpm离心30分钟;

[0161] (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。

[0162] (5)取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入61 μ L的5 $\times$ 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。

[0163] (6)蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0164] (7)将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0165] (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。

[0166] (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。

[0167] (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。

[0168] (11)电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0169] (12)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:将整个装置放置于大的冰盒中,同时转两张膜,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;

[0170] (13)转膜完成后一张膜使用去离子水冲净膜后,将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理;另一张膜直接进行封闭操作;

[0171] (14)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;

[0172] (15)加入一抗(小鼠 β -ACTIN):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0173] (16)洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0174] (17)加入红外荧光标记的二抗(Dylight800-Goat-anti-Mouse),稀释比例为1:8000,室温反应2小时;

[0175] (18)洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0176] (19)采用仪器直接对免疫印迹膜显色观察并照相。

[0177] 实验结果显示,封闭之前经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理的印迹膜采用红外荧光标记的二抗进行反应后印迹膜的信号强度(图5B)显著高于未经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理过的印迹膜(图5A),信号增强倍数平均为4~17倍(表5)。

[0178] 实施例5

[0179] 1、实验方法

[0180] (1)分别称取水稻、玉米、大豆、小麦叶片组织使用液氮磨成粉末按照100mg加入1毫升的比例加入通用型高效总蛋白质提取试剂并充分混匀。

[0181] (2)冰上孵育45分钟。

[0182] (3)4℃,13000rpm离心30分钟。

[0183] (4)收集的上清即为植物总蛋白提取物,可以进行后续实验操作。

[0184] (5)取24 μ L提取出的蛋白质溶液,加入6 μ L的5 $\times$ 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。

[0185] (6)蛋白浓度的测定:采用Bradford方法进行蛋白质浓度的测定。

[0186] (7)将清洗过的1.0mm厚的玻璃板固定于灌胶架上。

[0187] (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。

[0188] (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。

[0189] (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。

[0190] (11)电泳结束后,分开两块玻璃板,切除浓缩胶。

[0191] (12)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:将整个装置放置于大的冰盒中,同时转两张膜,加入转膜缓冲液(恒流:400mA)转2个小时;
 [0192] (13)转膜完成后一张膜使用去离子水冲净膜后,将膜浸入蛋白质免疫印迹信号增强剂中于摇床上晃动30分钟后,使用PBS洗涤膜2次,每次10分钟,洗涤后封闭处理;另一张膜直接进行封闭操作;

[0193] (14)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;

[0194] (15)加入一抗(TUBULIN):稀释比例为1:1000,室温反应2小时;

[0195] (16)洗膜:TBST(TBS+0.1%Tween 20)洗5次,每次5min;

[0196] (17)加入二抗(HRP-Goat-anti-Rabbit),稀释比例为1:5000,室温反应2小时;

[0197] (18)洗膜:TBST洗5次,每次5min。

[0198] (19)采用化学底物发光试剂盒进行免疫印迹膜的显色观察。

[0199] 2、实验结果

[0200] 实验结果显示,不同植物种类的全蛋白在转膜后经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理的印迹膜的信号强度(图5B)显著高于未经过蛋白质免疫印迹信号增强剂处理过的印迹膜(图5A),信号增强倍数平均为3.39倍(表5)。

表1、PVDF膜转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用化学发光法检测的信号强度比对比表;

	Volume A		Volume B	增强倍数
1	201586	1	291136	1.444227
2	147465	2	282888	1.91834
3	173330	3	243393	1.404217
4	84034	4	173409	2.063558

表2、硝酸纤维素膜转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用化学发光法检测的信号强度比对比表

	Volume A		Volume B	增强倍数
1	226513.4	1	393957	1.739221
2	126280.1	2	484480	3.836552
3	229178.3	3	422075	1.841688
4	120042.7	4	215500	1.795194

表3、PVDF膜转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用碱性磷酸酶底物显色法检测的信号强度比对比表

	Volume A		Volume B	增强倍数
1	21683.98	1	1587438	73.20787
2	38577.04	2	1575297	40.83509
3	58220.99	3	1644097	28.2389
4	75616.46	4	1772601	23.442

表4、PVDF膜转膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用荧光显色法检测的信号强度比对比表

	Volume A		Volume B	增强倍数
--	----------	--	----------	------

1	313323.3	1	1343634	4.288331
2	296347.6	2	1218207	4.110737
3	165340.5	3	1025429	6.201923
4	50531.15	4	889052	17.59414

表5、植物蛋白类转PVDF膜后使用蛋白质免疫印迹信号增强剂处理前后并使用化学发光法检测的信号强度对比表

	Volume A		Volume B	增强倍数
1	457184	1	663028	1.450243
2	63286	2	263783	4.16811
3	101789	3	345357	3.392872
4	83245	4	385150	4.626704

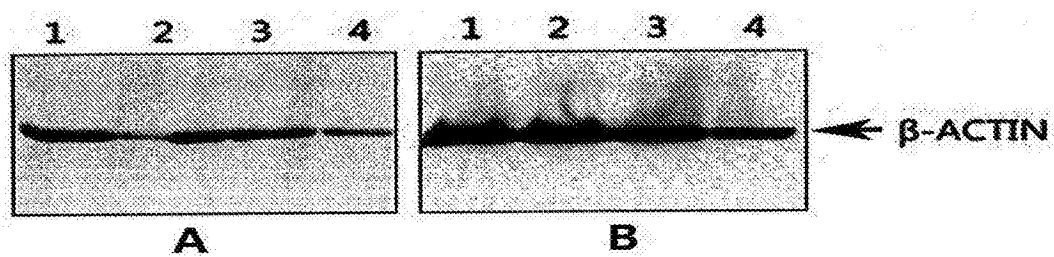


图1

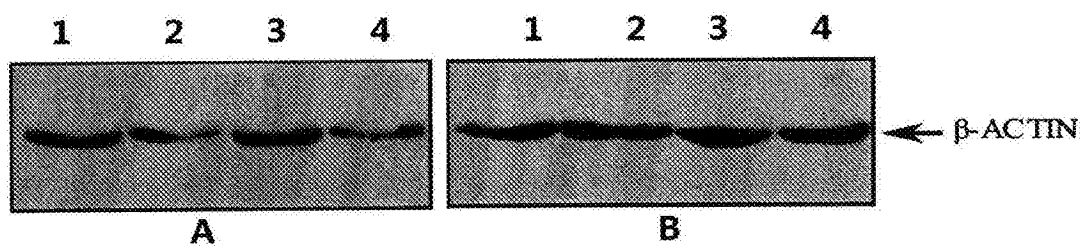


图2

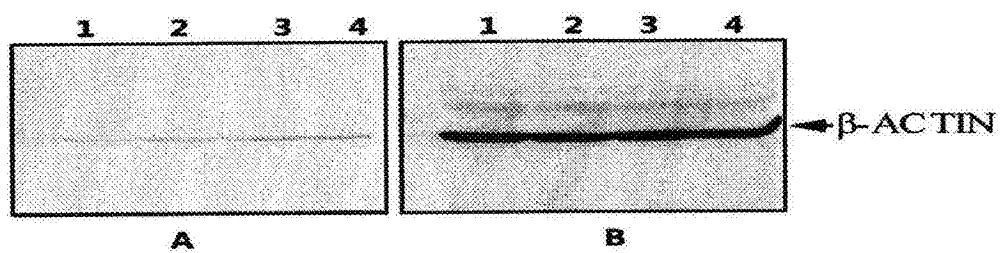


图3

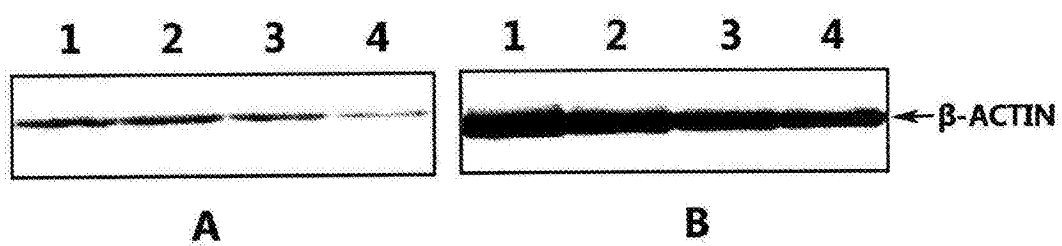


图4

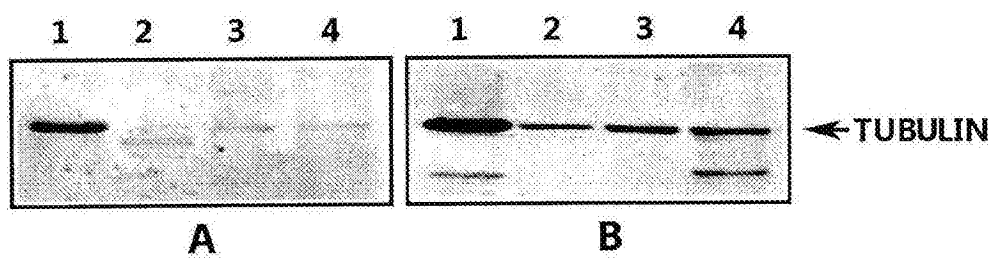


图5

专利名称(译)	一种蛋白质免疫印迹信号增强剂		
公开(公告)号	CN107271657A	公开(公告)日	2017-10-20
申请号	CN201610220215.3	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	CN107271657B		
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信号增强剂。此增强剂能将蛋白质免疫印迹检测中的信号强度和灵敏度平均提高3~10倍，显著降低背景。此增强剂使用方法简单，并可用于PVDF膜或硝酸纤维素膜，并与底物显色法、化学发光显色法及荧光显色法兼容。

