



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110297085 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910511201.0

(22)申请日 2019.06.13

(71)申请人 武汉博士德生物工程有限公司

地址 430000 湖北省武汉市洪山区东湖开
发区关山二路特一号国际企业中心3-
502室

(72)发明人 夏一方 陈莉 胡方影 胡良波
乐杨静

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限
公司 11212

代理人 赵秀斌

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

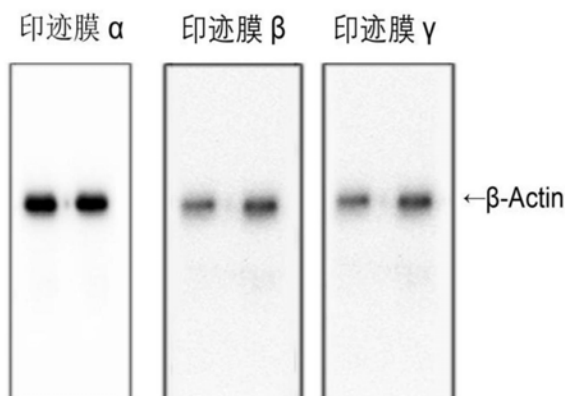
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀
释液

(57)摘要

本发明涉及一种用于增强免疫印迹检测信
号的抗体稀释液,每1L抗体稀释液包括:聚乙烯
醇0.25~2.5g,聚乙烯吡咯烷酮0.25~2.5g,表
面活性剂0.1~2g,卡松防腐剂0.015~0.75mL,
余量为0.01~0.1mol/L的TBS缓冲液,所述TBS缓
冲液的pH为7.2~7.6。本发明的用于增强免疫印
迹检测信号的抗体稀释液可以用于免疫印迹检
测的抗体稀释,避免蛋白质引起的污染产生的较
高背景,显示出较强的信噪比,同时增强免疫印
迹信号强度和灵敏度。



1. 一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液,其特征在于,每1L抗体稀释液包括:
聚乙烯醇0.25~2.5g,聚乙烯吡络烷酮0.25~2.5g,表面活性剂0.1~2g,卡松防腐剂0.015~0.75mL,余量为0.01~0.1mol/L的TBS缓冲液,所述TBS缓冲液的pH为7.2~7.6。
2. 根据权利要求1所述的一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液,其特征在于,所述表面活性剂为烷基糖苷。
3. 根据权利要求2所述的一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液,其特征在于,每1L抗体稀释液包括:
聚乙烯醇1g,聚乙烯吡络烷酮0.5g,烷基糖苷1g,卡松防腐剂0.15mL,余量为0.02mol/L的TBS缓冲液,所述TBS缓冲液的pH为7.2~7.6。

一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫印迹检测技术领域,具体涉及一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液。

背景技术

[0002] 免疫印迹检测时分子生物学、生物化学和免疫遗传学等生命科学研究中常用的一种试验方法,其原理是通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳区分待测样品不同组分,再在电流的作用下,使蛋白质从凝胶转移至印迹膜上,通过特异性抗体作为探针,对靶抗原蛋白质进行检测,通过分析特异性反应的位置和强度获得特定蛋白质在所分析的细胞和/或组织中的表达情况的信息,免疫印迹检测过程中可以应用DAB显色,ECL化学发光底物显色,荧光标记的二抗直接显色等,该技术已经被广泛应用于蛋白质表达水平的检测中。

[0003] 抗体稀释液是在免疫印迹检测时用于一抗和二抗的稀释和配制。

[0004] 现有的免疫印迹检测时用的抗体稀释液通常由牛血清蛋白(BSA)、脱脂牛奶、酪蛋白、动物明胶等蛋白质配制而成,易导致抗原或抗体的交叉污染,产生的背景较高,信噪比较低,且无信号增强作用。

发明内容

[0005] 本发明为解决以上技术问题提供了一种信噪比低、能够增强免疫印迹的信号强度和灵敏度的抗体稀释液。

[0006] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液,每1L稀释液包括:聚乙烯醇0.25~2.5g,聚乙烯吡咯烷酮0.25~2.5g,表面活性剂0.1~2g,卡松防腐剂0.015~0.75mL,余量为0.01~0.1mol/L的TBS缓冲液,所述TBS缓冲液的pH为7.2~7.6。

[0007] 进一步,所述表面活性剂为烷基糖苷。

[0008] 进一步,每1L抗体稀释液包括:聚乙烯醇1g,聚乙烯吡咯烷酮0.5g,烷基糖苷1g,卡松防腐剂0.15mL,余量为0.02mol/L的TBS缓冲液,所述TBS缓冲液的pH为7.2~7.6。

[0009] 本发明的有益效果是:本发明的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液能够用于免疫印迹检测中一抗和二抗的孵育,待检测蛋白质结合在硝酸纤维素膜或聚偏二氟乙烯膜等固相支持物上,其中聚乙烯醇和聚乙烯吡咯烷酮能够增强抗体和膜上的蛋白质的结合,从而增强免疫印迹检测的信号强度和灵敏度,同时该抗体稀释液中并不存在常规蛋白质成分(如牛血清蛋白、脱脂牛奶、酪蛋白等),可以有效避免外源蛋白引起的抗原抗体的非特异性结合,降低背景,显示出较强的信噪比。

附图说明

[0010] 图1为本发明免疫印迹检测的成像图;

具体实施方式

[0011] 以下结合附图及具体实施例对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0012] 实施例1

[0013] 配制1L浓度为0.02mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液,具体配制方法如下:称取Tris 2.42g、NaCl 5.84g溶于800mL蒸馏水中,用HCl将pH调至7.2~7.6,然后加蒸馏水定容至1L。

[0014] 取800mL配制好的TBS缓冲液,加入1g聚乙烯醇、0.5g聚乙烯吡咯烷酮和1g烷基糖苷,搅拌均匀,量取1mL浓度为15%的卡松溶液,加入800mLTBS缓冲液中,然后用TBS缓冲液定容至1L。

[0015] 实施例2

[0016] 配制1L浓度为0.01mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液,具体配制方法如下:称取Tris 1.21g、NaCl 5.84g溶于800mL蒸馏水中,用HCl将pH调至7.2~7.6,然后加蒸馏水定容至1L。

[0017] 取800mL配制好的TBS缓冲液,加入0.25g聚乙烯醇、1g聚乙烯吡咯烷酮和0.1g烷基糖苷,搅拌均匀,量取0.1mL浓度为15%的卡松溶液,加入800mL TBS缓冲液中,然后用TBS缓冲液定容至1L。

[0018] 实施例3

[0019] 配制1L浓度为0.1mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液,具体配制方法如下:称取Tris 12.1g、NaCl 5.84g溶于800mL蒸馏水中,用HCl将pH调至7.2~7.6,然后加蒸馏水定容至1L。

[0020] 取800mL配制好的TBS缓冲液,加入1g聚乙烯醇、2.5g聚乙烯吡咯烷酮和1g烷基糖苷,搅拌均匀,量取5mL浓度为15%的卡松溶液,加入800mLTBS缓冲液中,然后用TBS缓冲液定容至1L。

[0021] 实施例4

[0022] 配制1L浓度为0.02mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液,具体配制方法如下:称取Tris 2.42g、NaCl 5.84g溶于800mL蒸馏水中,用HCl将pH调至7.2~7.6,然后加蒸馏水定容至1L。

[0023] 取800mL配制好的TBS缓冲液,加入2.5g聚乙烯醇、0.25g聚乙烯吡咯烷酮和2g烷基糖苷,搅拌均匀,量取1mL浓度为15%的卡松溶液,加入800mL TBS缓冲液中,然后用TBS缓冲液定容至1L。

[0024] 对比例1

[0025] 配制常规抗体稀释液1号,其配制方法如下:每1L抗体稀释液1号中含有50g脱脂奶粉,0.5mL Tween-20,余量为浓度为0.02mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液。

[0026] 对比例2

[0027] 配制常规抗体稀释液2号,其配制方法如下:每1L抗体稀释液2号中含有30g牛血清蛋白(BSA),0.5mL Tween-20,余量为浓度为0.02mol/L的pH为7.2~7.6的TBS缓冲液。

[0028] 试验例

[0029] 利用实施例1和对比例1、2中制备的抗体稀释液分别进行免疫印迹检测,具体步骤

如下：

[0030] (1) 配制SDS-PAGE凝胶，其中浓缩胶浓度为5%，分离胶浓度为10%；

[0031] (2) 电泳：在同一块凝胶上的6个样品孔中依次将样本A、样本B、样本A、样本B、样本A、样本B进行上样并电泳，其中浓缩胶电压55V，分离胶电压75V，电泳2h左右；

[0032] (3) 转膜：将电泳分离的6个泳道的样本蛋白自凝胶转移至印迹膜上，转膜时间为70min，电流值为150mA；

[0033] (4) 封闭：用封闭液处理印迹膜，室温下摇床上摇动1.5h，以封闭印迹膜上剩余的疏水结合位点；

[0034] (5) 孵育一抗：

[0035] 将上述印迹膜剪开使之分成3张小膜，分别为印迹膜 α 、印迹膜 β 和印迹膜 γ ，每张小膜上均有蛋白样本A和蛋白样本B对应的泳道；

[0036] 将一抗 β -Actin用实施例1制备的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液稀释至0.5ug/ml，然后用稀释后的一抗 β -Actin孵育印迹膜 α ，孵育条件为4℃摇床摇动15小时；

[0037] 将一抗 β -Actin用对比例1制备的常规抗体稀释液1号稀释至0.5ug/ml，然后用稀释后的一抗 β -Actin孵育印迹膜 β ，孵育条件为4℃摇床摇动15小时；

[0038] 将一抗 β -Actin用对比例2制备的常规抗体稀释液2号稀释至0.5ug/ml，然后用稀释后的一抗 β -Actin孵育印迹膜 γ ，孵育条件为4℃摇床摇动15小时；

[0039] (6) 洗膜：将印迹膜 α 、印迹膜 β 和印迹膜 γ 用TBST洗膜3次，每次5分钟；

[0040] (7) 孵育二抗：

[0041] 将HRP-羊抗兔用实施例1制备的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液1：10000稀释，然后用稀释后的HRP-羊抗兔二抗孵育印迹膜 α ，孵育条件为4℃摇床摇动1.5小时；

[0042] 将HRP-羊抗兔用对比例1制备的常规抗体稀释液1号1：10000稀释，然后用稀释后的HRP-羊抗兔二抗孵育印迹膜 β ，孵育条件为4℃摇床摇动1.5小时；

[0043] 将HRP-羊抗兔用对比例2制备的常规抗体稀释液2号1：10000稀释，然后用稀释后的HRP-羊抗兔二抗孵育印迹膜 γ ，孵育条件为4℃摇床摇动1.5小时；

[0044] (8) 洗膜：将印迹膜 α 、印迹膜 β 和印迹膜 γ 用TBST洗膜3次，每次10分钟；

[0045] (9) ECL发光显色：同时将印迹膜 α 、印迹膜 β 和印迹膜 γ 于自动城乡分析仪上自动成像。

[0046] 自动成像的结果如图1所示，其中印迹膜 α 、印迹膜 β 和印迹膜 γ 上自左至右分别为样本A和样本B，印迹膜 α 上目的蛋白条带信号强度强于印迹膜 β 和印迹膜 γ ，背景比印迹膜 β 和印迹膜 γ 低，信噪比比印迹膜 β 和印迹膜 γ 高；用实施例2、3和4中制备的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液进行免疫印迹检测蛋白信号强于也强于对比例1和对比例2，背景比使用对比例1和对比例2低，信噪比比使用对比例1和对比例2高。经实验验证，本发明的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液可以用于免疫印迹检测的抗体稀释，避免蛋白质引起的污染产生的较高背景，显示出较强的信噪比，同时增强免疫印迹信号强度和灵敏度。

[0047] 以上所述仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

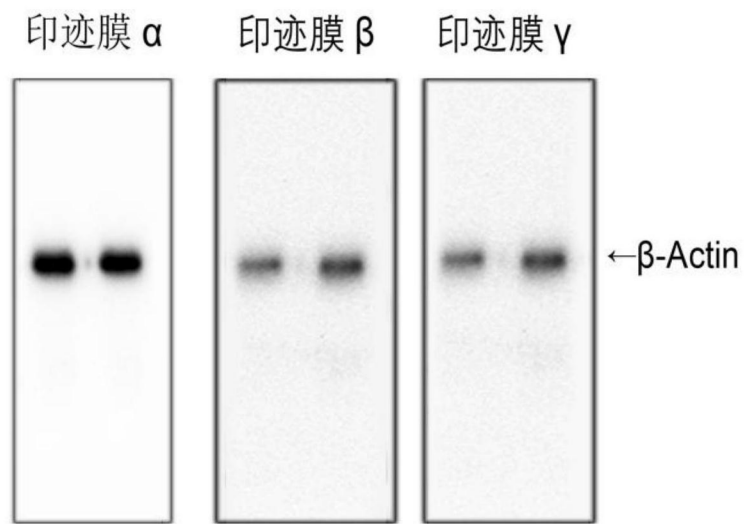


图1

专利名称(译)	一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液		
公开(公告)号	CN110297085A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910511201.0	申请日	2019-06-13
[标]发明人	夏一方 陈莉 胡方影 胡良波		
发明人	夏一方 陈莉 胡方影 胡良波 乐杨静		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液，每1L抗体稀释液包括：聚乙烯醇0.25～2.5g，聚乙烯吡咯烷酮0.25～2.5g，表面活性剂0.1～2g，卡松防腐剂0.015～0.75mL，余量为0.01～0.1mol/L的TBS缓冲液，所述TBS缓冲液的pH为7.2～7.6。本发明的用于增强免疫印迹检测信号的抗体稀释液可以用于免疫印迹检测的抗体稀释，避免蛋白质引起的污染产生的较高背景，显示出较强的信噪比，同时增强免疫印迹信号强度和灵敏度。

