



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108061795 B

(45)授权公告日 2020.02.18

(21)申请号 201711194001.4

(22)申请日 2017.11.24

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108061795 A

(43)申请公布日 2018.05.22

(73)专利权人 大连医科大学

地址 116044 辽宁省大连市旅顺口区旅顺
南路西段九号

(72)发明人 董伟杰 孙赫彬 徐晶 黄郭凌

李志 刘钢

(74)专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220

代理人 闪红霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 1422280 A, 2003.06.04,

审查员 张婷

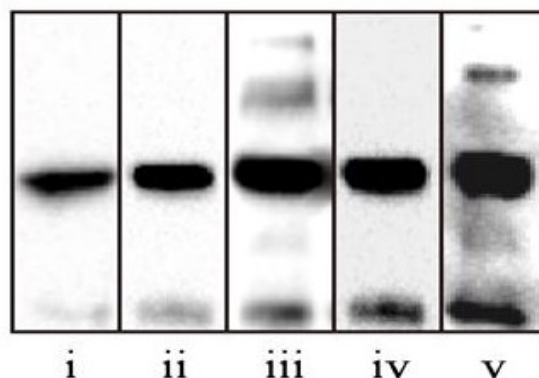
权利要求书1页 说明书3页 附图4页

(54)发明名称

提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法

(57)摘要

本发明公开一种提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法,有将蛋白质转移至硝酸纤维素薄膜及封闭步骤,其特征在于:将被转移上蛋白质的硝酸纤维素薄膜放入0~25℃的50%甲醇中轻柔震荡30 min,取出后室温放置10 min,然后50~100℃加热30 min,待恢复至室温后再进行封闭。操作简单,可有效避免蛋白质在洗净液反复洗涤及孵育过程中发生从膜上脱离现象,使Western blot能准确反应抗原含量且实验结果再现性强,提高了蛋白质免疫印迹法检测的灵敏度,特别适用于来源珍贵的痕量样品检测和分析。



1. 一种提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法, 有将蛋白质转移至硝酸纤维素薄膜、封闭及免疫染色步骤, 其特征在于: 将被转移上蛋白质的硝酸纤维素薄膜放入0~25℃的50%甲醇中轻柔震荡30 min, 取出后室温放置10 min; 然后50℃加热30 min, 待恢复至室温后再进行封闭, 采用Hp抗体、IgG抗体或ST6Gal1抗体进行免疫染色, 或者100℃加热30 min, 待恢复至室温后再进行封闭, 采用凝集素进行免疫染色。

提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质免疫印迹法,尤其是一种检测结果准确且再现性好,可提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法。

背景技术

[0002] 蛋白质免疫印迹法(Western blot)由Harry Towbin实验室发明创造,是基础科学研究和临床实验中最常用的蛋白质分析工具。具体方法是根据蛋白质分子量、电荷和构象不同,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)或十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离天然蛋白质或变性蛋白质;凝胶上被分离的蛋白质条带,常用湿转或半干转的方式转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜、聚偏氟乙烯膜)上,固相载体以非共价键方式吸附蛋白质,并能保持电泳分离多肽的生物学活性不变;使用脱脂奶粉、牛血清白蛋白(BSA)等溶液进行封闭;使用含有表面活性剂Tween-20的洗液进行洗涤,以防止一抗与固相载体的非特异性结合所造成的染色背景过深现象;被转移到固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原,与相应的抗体形成抗原-抗体复合物,再与酶或同位素标记的第二抗体结合,经底物显色或放射自显影以检测电泳分离的目的蛋白。现有方法的膜上蛋白质在用含有诸如吐温20等表面活性剂的洗净液反复洗涤和孵育过程中,会发生不同程度的脱离,致使Western blot存在不能准确反应抗原含量和实验结果再现性差等缺点。

发明内容

[0003] 本发明是为了解决现有技术所存在的上述技术问题,提供一种结果准确且再现性好,可提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法。

[0004] 本发明的技术解决方案是:一种提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法,有将蛋白质转移至硝酸纤维素薄膜及封闭步骤,其特征在于:将被转移上蛋白质的硝酸纤维素薄膜放入0~25℃的50%甲醇中轻柔震荡30 min,取出后室温放置10 min,然后50~100℃加热30 min,待恢复至室温后再进行封闭。

[0005] 本发明是在转膜后(蛋白质转移至硝酸纤维素薄膜)及封闭前这段时间内进行处理的方法,操作简单,可有效避免膜上蛋白质在洗净液孵育和反复洗涤过程中发生脱离的现象,使得Western blot能准确反应抗原含量且实验结果再现性好,提高了蛋白质免疫印迹法检测灵敏度,特别适用于来源珍贵的痕量样品检测和分析。

附图说明

[0006] 图1是本发明实施例1与其他蛋白质免疫印迹法的免疫染色图。

[0007] 图2是本发明实施例1与现有蛋白质免疫印迹法不同抗体的免疫染色图。

[0008] 图3是本发明实施例1与现有蛋白质免疫印迹法重现性对比图。

[0009] 图4是本发明实施例2与其他蛋白质免疫印迹法的免疫染色图。

[0010] 图5是本发明实施例2与现有蛋白质免疫印迹法不同凝集素的免疫染色图。

[0011] 图6是本发明实施例2与现有蛋白质免疫印迹法重现性对比图。

具体实施方式

[0012] 实施例1:

[0013] 按照现有技术蛋白质免疫印迹法将健康人血清蛋白质(10 μ g)进行前期处理及10%SDS-PAGE电泳后转到硝酸纤维素膜(NC)上,之后再按照本发明的方法:将被转移上蛋白质的NC膜放入0 $^{\circ}$ C的50%甲醇中轻柔震荡30 min,取出后室温放置10 min,然后50 $^{\circ}$ C加热处理30 min,待恢复室温(18~25 $^{\circ}$ C)后用0.5%小牛血清白蛋白BSA进行封闭,后续的抗体孵育、洗膜和检测等均按照现有技术方法,采用驴抗人的IgG抗体进行免疫染色。

[0014] 图1为本发明实施例1与其他蛋白质免疫印迹法的免疫染色图。

[0015] 图1中i:现有方法,转膜后直接封闭;ii:转膜后在室温下干燥30 min后封闭;iii:转膜后50 $^{\circ}$ C加热30 min后封闭;iv:转膜后浸入0 $^{\circ}$ C的50%甲醇后30 min封闭;v:本发明实施例1。

[0016] 结论:不同处理方法中本发明实施例1的免疫染色效果最佳。

[0017] 图2是本发明实施例1(不同浓度)与现有蛋白质免疫印迹法不同抗体(HP、IgG、ST6Gal1、EFF1A2)的免疫染色图。

[0018] 图2中数字表示血清蛋白质上样量(μ g)及敏感度;a)现有技术;b)本发明实施例1,c)柱形图是灰度分析结果(黑色:现有技术;白色:本发明实施例1)。

[0019] 结论:应用不同抗体进行免疫染色,比较现有技术与本发明实施例1敏感度强弱,应用image lab软件进行灰度分析得出结论,本发明实施例1的敏感度是现有技术的1.5~10倍。

[0020] 图3是本发明实施例1与现有蛋白质免疫印迹法重现性对比图。

[0021] 图3中从上之下分别是现有方法(TM)和本发明实施例1(FM)的不同抗体(HP、EFF1A2、IgG)染色图,柱形图是灰度分析结果。

[0022] 结论:应用不同抗体进行免疫染色,应用image lab软件进行灰度分析得出结论,本发明实施例1的重现性明显优于传统方法。

[0023] 实施例2:

[0024] 按照现有技术蛋白质免疫印迹法将健康人血清蛋白质(6 μ g)进行前期处理及10%SDS-PAGE电泳后转到硝酸纤维素膜(NC)上,之后再按照本发明的方法:将被转移上蛋白质的NC膜放入室温(18~25 $^{\circ}$ C)的50%甲醇中轻柔震荡30 min,取出后室温放置10 min,然后100 $^{\circ}$ C加热处理30 min,待恢复室温(18~25 $^{\circ}$ C)后用0.5%小牛血清白蛋白BSA进行封闭,后续的抗体孵育、洗膜和检测等均按照现有技术方法,采用凝集素进行免疫染色。

[0025] 图4为本发明实施例2与其他蛋白质免疫印迹法的凝集素(LCA,SNA)免疫染色图。上面为凝集素LCA染色,下面为凝集素SNA染色。

[0026] 图4中:i:现有方法,转膜后直接封闭;ii:转膜后在室温下干燥30 min后封闭;iii:转膜后100 $^{\circ}$ C加热30 min后封闭;iv:转膜后浸入室温50%甲醇30 min后封闭;v:本发明实施例2。

[0027] 结论:不同处理方法中本发明实施例2的免疫染色效果最佳。

[0028] 图5是本发明实施例2(不同浓度)与现有蛋白质免疫印迹法不同凝集素(PHA-E、

LCA、PHA-L、AAL)的免疫染色图。

[0029] 图5中数字表示血清蛋白质上样量(μg)及敏感度;a)现有技术;b)本发明实施例2,c)柱形图是灰度分析结果(黑色:现有技术;白色:本发明实施例2)。

[0030] 结论:应用不同凝集素进行免疫染色,比较现有技术与本发明实施例2敏感度强弱,应用imageJ和quantity one软件进行灰度分析得出结论,本发明实施例2的敏感度是现有技术的1.7~13倍。

[0031] 图6是本发明实施例2与现有蛋白质免疫印迹法重现性对比图。

[0032] 图6中从上至下分别是现有方法(TM)和本发明实施例1(FM)的不同凝集素(PHA-E、AAL、LCA)染色图,柱形图是灰度分析结果。

[0033] 结论:应用不同凝集素进行免疫染色,应用image lab软件进行灰度分析得出结论,本发明实施例2的重现性明显优于传统方法。

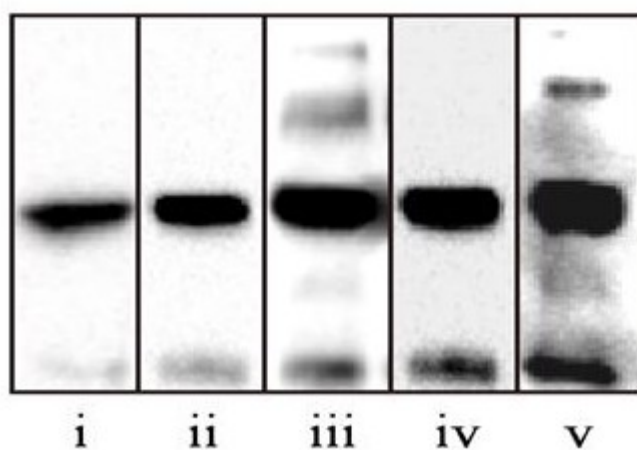


图1

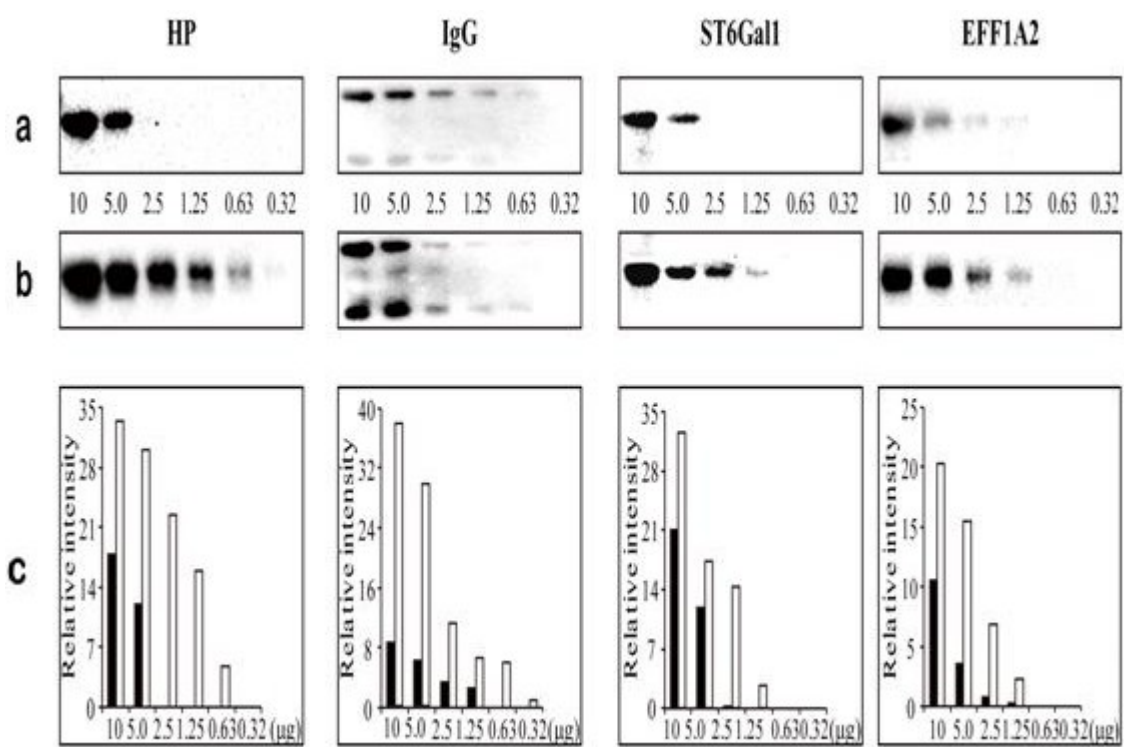


图2

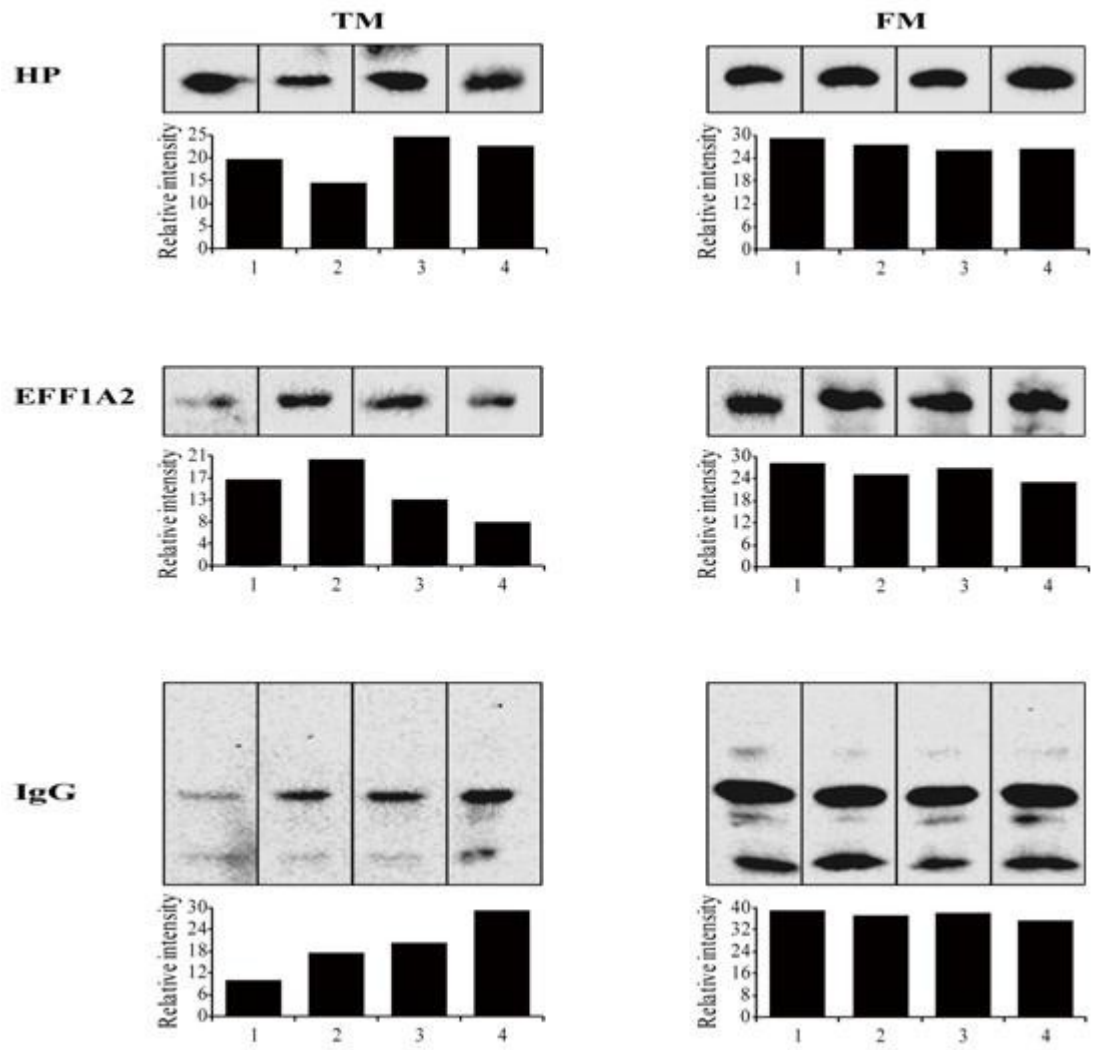


图3

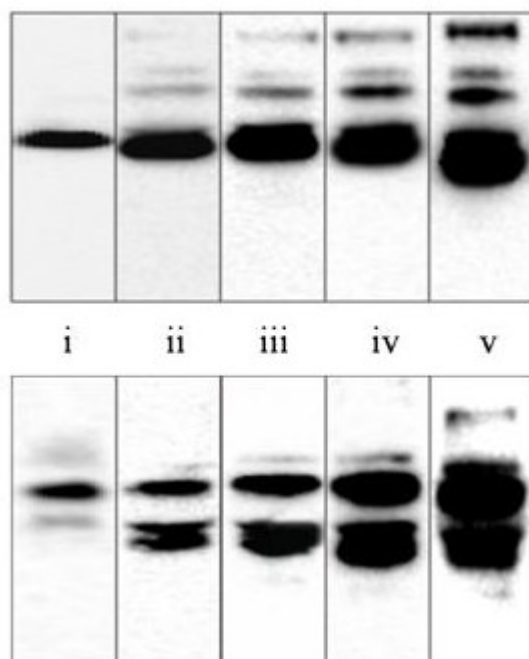


图4

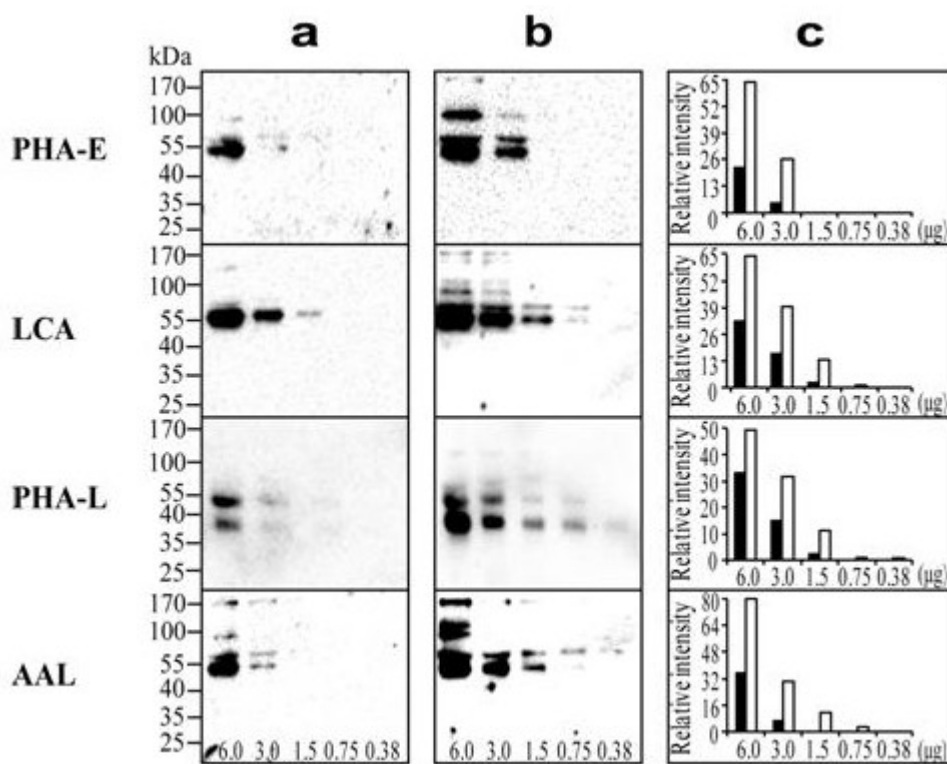


图5

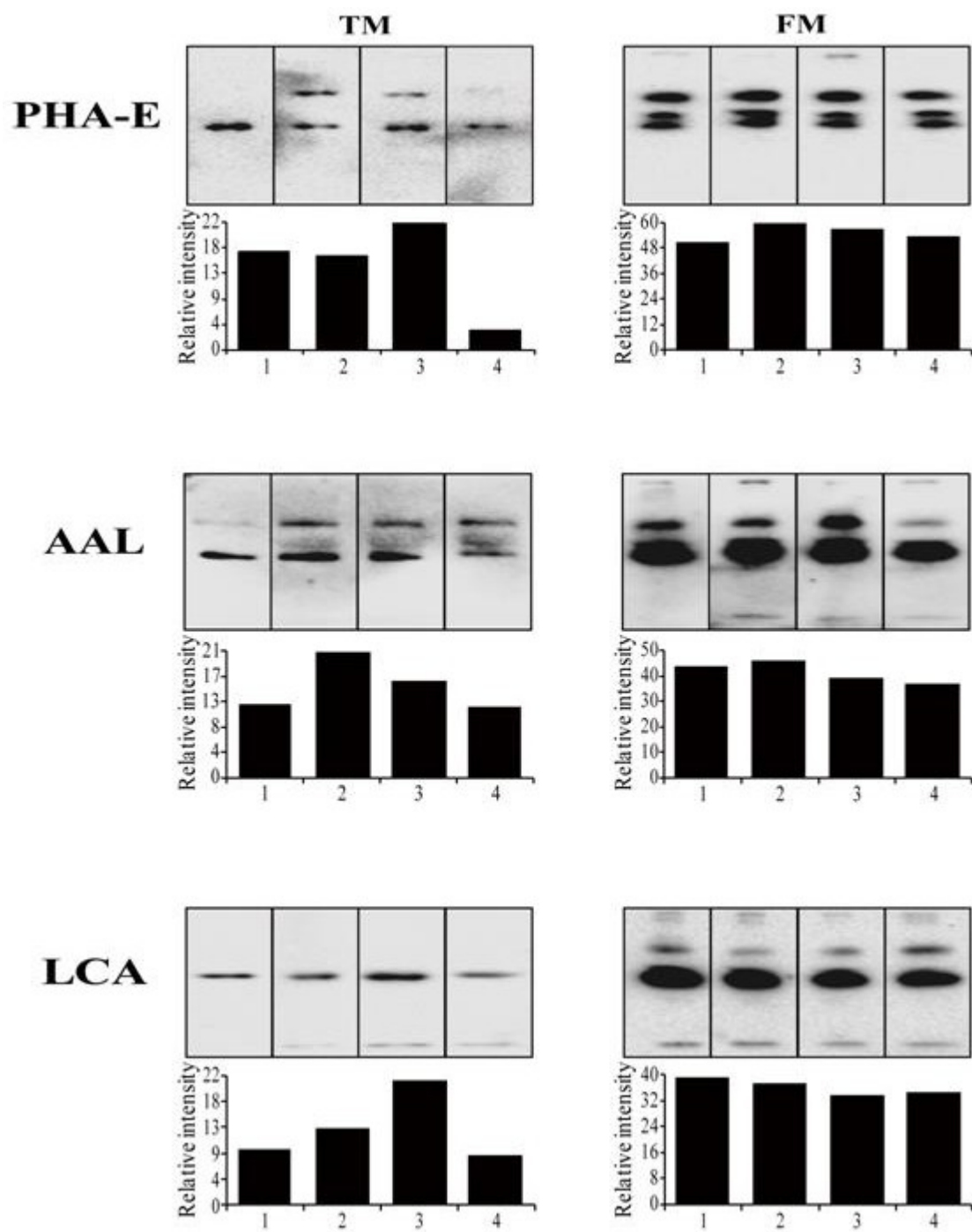


图6

专利名称(译)	提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法		
公开(公告)号	CN108061795B	公开(公告)日	2020-02-18
申请号	CN201711194001.4	申请日	2017-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连医科大学		
[标]发明人	董伟杰 孙赫彬 徐晶 黄郭凌 李志 刘钢		
发明人	董伟杰 孙赫彬 徐晶 黄郭凌 李志 刘钢		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
审查员(译)	张婷		
其他公开文献	CN108061795A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种提高检测灵敏度的蛋白质免疫印迹法，有将蛋白质转移至硝酸纤维素薄膜及封闭步骤，其特征在于：将被转移上蛋白质的硝酸纤维素薄膜放入0~25℃的50%甲醇中轻柔震荡30 min，取出后室温放置10 min，然后50~100℃加热30 min，待恢复至室温后再进行封闭。操作简单，可有效避免蛋白质在洗净液反复洗涤及孵育过程中发生从膜上脱离现象，使Western blot能准确反应抗原含量且实验结果再现性强，提高了蛋白质免疫印迹法检测的灵敏度，特别适用于来源珍贵的痕量样品检测和分析。

