



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101887045 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 17

(21) 申请号 200910051323. 2

(22) 申请日 2009. 05. 15

(71) 申请人 韩焕兴

地址 201100 上海市闵行区顾戴路 2199 弄
600 号

申请人 陆慧琦
樊笑霞

(72) 发明人 韩焕兴

(74) 专利代理机构 上海天翔知识产权代理有限
公司 31224

代理人 吕伴

(51) Int. Cl.

G01N 27/447(2006. 01)

G01N 33/559(2006. 01)

G01N 33/539(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用

(57) 摘要

本发明公开的一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用,包括如下步骤:(1)薄层琼脂糖凝胶常规电泳;(2)抗原或抗体的等电点的测定;(3)缓冲体系的设置;(4)待电泳物质的分别离子化处理,使其具备不同的带电状态;(5)对应抗原与抗体或标记抗体的对流电泳;(6)电泳结果的直接观察;(7)薄层琼脂糖凝胶的漂洗、固定和染色;(8)染色结果的观察与相对定量。所述抗体和标记抗体为金标抗体或微粒子胶体金标记抗体。本发明免疫扩散和免疫对流电泳的应用可增加检测敏感度,对显示的蛋白条带起到识别和增强识别作用。

1. 一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用,包括如下步骤:

- (1). 薄层琼脂糖凝胶常规电泳;
- (2). 抗原或抗体的等电点的测定;
- (3). 缓冲体系的设置;
- (4). 待电泳物质的分别离子化处理,使其具备不同的带电状态;
- (5). 对应抗原与抗体或标记抗体的对流电泳;
- (6). 电泳结果的直接观察;
- (7). 薄层琼脂糖凝胶的漂洗、固定和染色;
- (8). 染色结果的观察与相对定量。

2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述抗体和标记抗体为金标抗体或微粒子胶体金标记抗体。

一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种薄层琼脂糖凝胶的用途,特别涉及薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用。

背景技术

[0002] 电泳是带电颗粒在电场作用下,向着与其所带电荷相反的电极移动的现象。带电颗粒在电场中泳动的速度与带电颗粒的净电荷量成正比,与带电颗粒的大小成反比。在一定的条件下,任何带电颗粒都具有自己的特定泳动度。利用此性质,便可把混合液中不同的蛋白质(或其它物质)分离开,也可用其对样品的纯度进行鉴定。

[0003] 电泳法可分为自由电泳及区带电泳两大类。常用的区带电泳包括滤纸电泳、薄层电泳、凝胶电泳等。其中凝胶电泳就是以淀粉胶、琼脂或琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等作为支持介质的区带电泳法。

[0004] 琼脂电泳是用琼脂糖或优质琼脂粉作为支持物的一种电泳方法。这种方法用于研究核酸等大分子物质效果很好。因此它已成为分子生物学工作中不可缺少的工具之一。琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖。其结构单元是 D-半乳糖和 3,6-脱水-L-半乳糖。琼脂糖链通过氢键及其它力量的作用互相盘绕形成绳状琼脂糖束,构成大网孔型凝胶。利用琼脂糖电泳分离和分析蛋白质和核酸的基本原理是电荷效应及分子筛效应。在电场的作用下及中性 pH 的缓冲条件下,核酸分子带负电,可以向阳极迁移。用琼脂糖胶分离双链 DNA 时,迁移率的大小主要与核酸样品的分子量有关,而与核酸的一级结构以及碱基的组成无关。琼脂糖电泳对于分离或分析天然 DNA,包括不同形式的质粒 DNA(即闭环 DNA、开环 DNA 和线性 DNA),以及不同分子量的核酸片段都有效。在一定浓度的琼脂糖凝胶介质中,DNA 分子的电泳迁移率与其分子量的常用对数成反比。因此采用不同浓度的凝胶可以分离不同大小范围的 DNA 片段。0.8%的琼脂糖凝胶能很好地分辨 1-25kb 的片段;0.5%的琼脂糖凝胶用于分辨较大片段的 DNA(20-100kb);对于小片段的 DNA(0.2-2kb)可用 1.5%或更高浓度的凝胶进行分离。同时分子构型也对迁移率有影响,如共价闭环 DNA > 直线 DNA > 开环双链 DNA。

[0005] 对流免疫电泳(counter immunoelectrophoresis, CIEP)是将双向免疫扩散与电泳相结合的一种技术。在 pH8.6 的缓冲液中,蛋白质抗原带负电荷向正极泳动;而抗体大部分属于 Ig,由于分子量大,暴露的极性基团较少,在离子琼脂中泳动缓慢,同时受电渗作用的影响向负极泳动(电渗是指在电场中液体对于一个固定固体的相对移动。琼脂是一种酸性物质,在碱性溶液中带负电荷,而与它接触的溶液带正电荷,因此液体向负极泳动,产生电渗)在抗原抗体相遇的最适比例处形成乳白色沉淀线。由于电场的作用,限制了抗原、抗体的自由扩散,而使其定向泳动,因而增加了试验的灵敏度,并缩短反应时间。此法操作简便,仅需 30~60 分钟,灵敏度比双向扩散高 10~15 倍;但缺点是特异性不如双向琼脂扩散高。

[0006] 目前在薄层琼脂糖胶的应用主要有两种,一是常规的蛋白或核酸电泳,二是在电

泳基础上的常规抗体的免疫扩散（呈现免疫沉淀和免疫固定的形式）。目前还没有薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中应用的相关报道。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用。

[0008] 本发明所要解决的技术问题可以通过以下技术方案来实现：

[0009] 一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用，包括如下步骤：

[0010] 1. 薄层琼脂糖凝胶常规电泳；

[0011] 2. 抗原或抗体的等电点的测定；

[0012] 3. 缓冲体系的设置；

[0013] 4. 待电泳物质的分别离子化处理，使其具备不同的带电状态；

[0014] 5. 对应抗原与抗体或标记抗体的对流电泳；

[0015] 6. 电泳结果的直接观察；

[0016] 7. 薄层琼脂糖凝胶的漂洗、固定和染色；

[0017] 8. 染色结果的观察与相对定量。

[0018] 所述抗体和标记抗体为金标抗体或微粒子胶体金标记抗体。

[0019] 本发明理论基础和优点如下：1. 蛋白质在偏离等电点的状态下带电荷，在电场的作用下向相反的电极泳动。2. 蛋白质作为抗原在遇到相应抗体时会发生结合反应，在合适的条件下可在半固体介质中形成沉淀线。3. 沉淀的形成在半固体介质中起到固定作用，游离的抗原抗体会由于扩散、电泳或洗涤作用脱离介质。4. 免疫对流的概念是不同带电状态的两种蛋白分子在电场中的相对泳动。5. 抗体是蛋白质带电体，金标记抗体、微粒子胶体金标记抗体也是带电体，可以在电场中泳动，可以通过体外处理使抗原抗体处于不同的带电状态，电泳速度明显不同甚至反向泳动，增加两者反应的机会和速度，提高敏感性。6. 免疫扩散和免疫对流电泳的应用可增加检测敏感度，对显示的蛋白条带起到识别和增强识别作用。

具体实施方式

[0020] 一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用，包括如下步骤：

[0021] 1. 薄层琼脂糖凝胶常规电泳。

[0022] 薄层琼脂糖凝胶常规电泳所使用的薄层琼脂胶片的配方是：琼脂糖 0.5-2.0wt%，其余为 pH 8.0-8.8 的巴比妥缓冲液，制备方法与常规的制备方法相同。

[0023] 整个仪器电泳过程如下：

[0024] 1). 试剂准备：

[0025] 染色液：每袋染色粉剂溶解于甲醇：水：冰醋酸 = 5 : 5 : 1 的溶液中，使用有效期见包装。

[0026] 使用前用 900ml 脱色液（甲醇：水：冰醋酸 = 5 : 5 : 1）稀释，充分混匀。稀释后的溶液在室温可存放 6 个月。

[0027] 脱色液：200ml 冰醋酸 + 1000ml 水 + 1000ml 甲醇，盖紧瓶盖。

- [0028] 2). 操作规程 :
- [0029] (1) 开机 :打开仪器电源开关。
- [0030] (2) 待仪器自检后,打开仪器盖板。
- [0031] (3) 放入样本盘,每孔加 10-20 μ l 血清。
- [0032] (4) 按需要放入新加样梳,在加样梳上加上骑码。
- [0033] (5) 在电极铜板上加电极液,将电泳膜放置在铜板上,小心勿出气泡。
- [0034] (6) 在胶桥上放置炭棒。
- [0035] (7) 用滤纸吸干电泳膜表面。
- [0036] (8) 按键选取血清蛋白电泳程序 (SPE),按 start 键 2 次,开始电泳,仪器自动操作。
- [0037] (9) 电泳毕,取出炭棒。
- [0038] (10) 用小铲铲去胶桥。
- [0039] (11) 染色 :
- [0040] 吹干电泳膜剩余水分,将电泳膜夹到染色架上,将染色架放回染色槽。按 test select 选取 SPE,按 start 键 2 次,开始染色,仪器自动操作。待染色结束后,取出胶膜。
- [0041] (12) 结果观察。
- [0042] 2. 抗原或抗体的等电点的测定 ;
- [0043] 1). 对抗原或抗体的结构作化学与生化分析 ;
- [0044] 2). 判断理论大致等电点 ;
- [0045] 3). 应用商品梯度胶和标准指示蛋白对抗原或抗体进行等电点测定 ;
- [0046] 3. 缓冲体系的设置 ;
- [0047] 根据梯度胶对抗原或抗体等电点测定的结果,分别选用巴比妥、磷酸盐、Tri- 甘氨酸等缓冲体系进行胶体的制备和缓冲液配制。
- [0048] 4. 待电泳物质的分别离子化处理,使其具备不同的带电状态 ;如将抗原设在阴极端,抗体设在阳极端。
- [0049] 5. 对应抗原与抗体或标记抗体的对流电泳 ;按常规对流电泳方法进行。
- [0050] 6. 电泳结果的直接观察 ;
- [0051] 7. 薄层琼脂糖凝胶的漂洗、固定和染色 ;有仪器染色与人工染色两种方式,按说明进行胶片的染色、固定与漂洗,形成最后的结果。
- [0052] 8. 染色结果的观察与相对定量。

专利名称(译)	一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用		
公开(公告)号	CN101887045A	公开(公告)日	2010-11-17
申请号	CN200910051323.2	申请日	2009-05-15
[标]发明人	韩焕兴		
发明人	韩焕兴		
IPC分类号	G01N27/447 G01N33/559 G01N33/539		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开的一种薄层琼脂糖凝胶在免疫对流电泳中的应用，包括如下步骤：(1)薄层琼脂糖凝胶常规电泳；(2)抗原或抗体的等电点的测定；(3)缓冲体系的设置；(4)待电泳物质的分别离子化处理，使其具备不同的带电状态；(5)对应抗原与抗体或标记抗体的对流电泳；(6)电泳结果的直接观察；(7)薄层琼脂糖凝胶的漂洗、固定和染色；(8)染色结果的观察与相对定量。所述抗体和标记抗体为金标抗体或微粒子胶体金标记抗体。本发明免疫扩散和免疫对流电泳的应用可增加检测敏感度，对显示的蛋白条带起到识别和增强识别作用。