

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910094170.X

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101498718A

[22] 申请日 2009.3.9

[21] 申请号 200910094170.X

[71] 申请人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路 253
号(昆明理工大学)

[72] 发明人 白 洁 王晟东 刘晓慧

[74] 专利代理机构 昆明今威专利代理有限公司

代理人 赛晓刚

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法

[57] 摘要

本发明公开了蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，包括蛋白定量、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗体标记、显影等步骤。该方法能在同一时间标记两种抗体，在一块 PVDF 膜同时标记抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta - actin 抗体。本发明抗体标记方法的两种抗体互不影响，利用这两种抗体可以一次性标记同一块 PVDF 膜，显影后条带清晰，且提高了效率，减少了剥膜中的操作误差，增加了其可比性。

- 1、蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，其特征在于包括蛋白定量、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗体标记、显影步骤。
- 2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中蛋白定量步骤采用 A 液与 B 液以 50: 1 的比例混合的 BCA 试剂定量所提取的蛋白，将蛋白提取液与 BCA 试剂加于酶标板，37°C30min 后测 OD562，再根据标准蛋白所做的标准曲线计算出所提取蛋白浓度，根据蛋白浓度来确定电泳时蛋白加样量。
- 3、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中聚丙烯酰胺凝胶电泳步骤采用蛋白定量步骤确定出的蛋白加样量加入蛋白，胶浓度 15%，电泳条件 180v, 100mA, 35min。
- 4、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中转膜步骤用转膜条件 100v, 350mA, 75min 将蛋白转至 PVDF 膜。
- 5、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中封闭步骤是转膜结束后，将 PVDF 膜取出，用 7%脱脂奶 TPBS 液封闭，4°C过夜。
- 6、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于其中抗体标记是将 PVDF 膜从脱脂奶中取出，用 TPBS 洗膜两次，每次 5min，标记一种抗体，室温 75min，洗膜三次，每次 5min 后，再标记第二种抗体，室温 75min，洗膜三次 10min，两次 5min 后即可显影。
- 7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于其中两种抗体优选两种特异性较好的一次抗体，相互之间没有相同的抗原结合位点。

蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法

技术领域

本发明属于蛋白免疫印迹实验，具体地，涉及蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，进一步涉及抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 蛋白抗体两种蛋白抗体在蛋白免疫印迹实验中同时标记的方法。

背景技术

蛋白免疫印迹法(Western Blotting)是利用抗体和抗原特性，检测细胞或组织中某一蛋白表达的常用方法。

现有技术中蛋白免疫印迹法一般的步骤为：首先是将所提取的蛋白定量后进行聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)，然后转膜将蛋白转至固体介质如 PVDF 膜上，再用相应的目的蛋白抗体作为探针进行标记、显影，根据条带变化来判断蛋白表达量的情况。为了确认蛋白加样量是否均匀，在实验过程中需要有内参(如 beta-actin)来指示，所以在同一块 PVDF 膜是要标记两个抗体，即标记目的蛋白抗体后还要剥膜，再标记内参的抗体。此种方法容易产生剥膜中的蛋白的不均匀损失，其可比性较弱。

现有技术中没有蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法的报道。

发明内容

本发明的目的在于提供一种蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，利用两种抗体可以一次性标记同一块PVDF膜，显影后条带清晰，且提高了效率，减少了剥膜中的误差，增加了其可比性；具有应用价值。

为了实现本发明的上述目的，本发明提供了如下的技术方案：

蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，包括蛋白定量、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗体标记、显影步骤。

蛋白定量步骤采用 A 液与 B 液以 50：1 的比例混合的 BCA 试剂定量所提取的蛋白，将蛋白提取液与 BCA 试剂加于酶标板，37℃30min 后测 OD562，再根据标准蛋

白所做的标准曲线计算出所提取蛋白浓度，根据蛋白浓度来确定电泳时蛋白的加样量。

聚丙烯酰胺凝胶电泳步骤采用蛋白定量步骤确定出的蛋白加样量加入蛋白，胶浓度 15%，电泳条件 180v，100mA，35min。

转膜步骤用转膜条件 100v，350mA，75min 将蛋白转至 PVDF 膜。

封闭步骤是转膜结束后，将 PVDF 膜取出，用 7%脱脂奶 TPBS 液封闭，4℃过夜。

抗体标记是将 PVDF 膜从脱脂奶中取出，用 TPBS 洗膜两次，每次 5min，标记一种抗体，室温 75min，洗膜三次，每次 5min 后，再标记第二种抗体，室温 75min，洗膜三次 10min，两次 5min 后即可显影。

其中两种抗体优选两种特异性较好的一次抗体，相互之间没有相同的抗原结合位点。

本发明旨在提供一种能在同一块 PVDF 膜上同时标记两种蛋白抗体的标记方法。

本方法选用了两种特异性较好的一次抗体(抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 抗体)，这两种抗体的目的蛋白分子量相差较为显著(硫氧还蛋白为 12KD，beta-actin 为 42KD)，且这两种抗体之间相互之间没有相同的抗原结合位点，这两种抗体最好是相同属来源。利用这两种抗体可以一次性标记同一块 PVDF 膜，显影后条带清晰，且提高了效率，减少了剥膜中的误差，增加了其可比性。具有应用价值。

抗人硫氧还蛋白抗体购自 Santa cruz 公司，分子量 12KD；抗人 beta-actin 蛋白抗体购自晶美生物公司，分子量 42KD。实验组蛋白为不同浓度的三七二醇刺激 MCF7 细胞后所提取的蛋白。

本发明所涉及的抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 蛋白抗体同时标记的步骤为：

(1) 蛋白定量：用 BCA 试剂(BCA 试剂 A 液与 B 液以 50: 1 的比例混合)定量所提

取的蛋白,将蛋白提取液 10ul 与 BCA 试剂 190ul 加于酶标板,37℃30min 后测 OD562,再根据标准蛋白所做的标准曲线计算出所提取蛋白浓度。根据蛋白浓度来确定电泳时蛋白的加样量;

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 胶浓度为 15%, 蛋白加样量 7ug, 电泳条件 180v, 100mA, 35min;

(3) 转膜: 转膜条件 100v, 350mA, 75min 将蛋白转至 PVDF 膜;

(4) 封闭: 转膜结束后, 将 PVDF 膜取出, 用 7%脱脂奶 TPBS 液封闭, 4℃过夜;

(5) 抗体标记: 将 PVDF 膜从脱脂奶中取出, 用 TPBS 洗膜两次, 每次 5min, 标记一抗(一抗溶液中含有鼠抗人硫氧还蛋白抗体 1: 2000 和抗人 beta-actin 抗体 1: 10000), 室温 75min, 洗膜三次, 每次 5min 后, 再标记二抗(抗鼠 IgG 1: 5000), 室温 75min, 洗膜三次 10min, 两次 5min 后即可显影;

(6) 显影: 将 PVDF 膜浸于化学发光底物中, 马上在暗室中显影, 将结果显示于胶片。

附图说明

图 1 为: 同时标记抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 抗体后显影结果显示;

图 2 为: 对比试验标记抗人硫氧还蛋白抗体后剥膜再标记抗人 beta-actin 抗体两次显影结果。

具体实施方式

下面结合附图, 用实施例来进一步说明本发明的实质性内容, 但并不以此限定本发明。

实施例 1 抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 蛋白抗体同时标记方法:

(1) 蛋白定量: 用 BCA 蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司, BCA 试剂 A 液与 B 液以 50: 1 的比例混合)定量所提取的蛋白, 将蛋白提取液 10ul 与 BCA

试剂混合液 190ul 加于酶标板, 37 度孵育 30min 后测 OD562, 再根据标准蛋白所做的标准曲线计算出所提取蛋白浓度。根据蛋白浓度来确定电泳时蛋白的加样量;

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 胶浓度为 15% (分离胶含聚丙烯酰胺和甲叉双丙稀酰胺混合物 15%, Tris 37.5mM pH8.8, 十二烷基磺酸钠 0.1%, 过硫酸铵 0.1%, TEMED 0.04%), 根据步骤 (1) 确定的蛋白加样量加入蛋白 7ug, 电泳条件 180v, 100mA, 35min (电泳液含 Tris25mM, 甘氨酸 200mM, 十二烷基磺酸钠 1%);

(3) 转膜: 转膜条件 100v, 350mA, 75min (转膜液含 Tris25mM, 甘氨酸 200mM, 甲醇 20%) 将蛋白转至 PVDF 膜;

(4) 封闭: 转膜结束后, 将 PVDF 膜取出, 用 7% 脱脂奶 TPBS 液 (TPBS 液含氯化钠 137mM, 氯化钾 2.7mM, 磷酸氢二钠 8mM, 磷酸二氢钾 1.5mM, 吐温 20 0.1%) 封闭, 4 度过夜;

(5) 抗体标记: 将 PVDF 膜从脱脂奶中取出, 用 TPBS 液洗膜两次 5min, 标记一抗 (一抗溶液中含有抗人硫氧还蛋白抗体 1:2000 和抗人 beta-actin 抗体 1:10000, TPBS 液配制), 室温 75min, TPBS 液洗膜三次 5min 后再标记二抗 (抗鼠 IgG 1:5000, TPBS 液配制), 室温 75min, TPBS 液洗膜三次 10min, 两次 5min 后即可显影;

(6) 显影: 加化学发光底物于 PVDF 膜上, 马上在暗室中显影, 将结果显示于胶片。

实施例 2 对比试验: 抗人硫氧还蛋白抗体和抗人 beta-actin 蛋白抗体两种抗体分标记的方法

(1) 蛋白定量: 用 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司, BCA 试剂 A 液与 B 液以 50:1 的比例混合) 定量所提取的蛋白, 将蛋白提取液 10ul 与 BCA 试剂混合液 190ul 加于酶标板, 37 度孵育 30min 后测 OD562, 再根据标准蛋白所做的标准曲线计算出所提取蛋白浓度。根据蛋白浓度来确定电泳时蛋白的加样量;

(2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 胶浓度为 15% (分离胶含聚丙烯酰胺和甲叉双丙稀酰

胺混合物 15%，Tris 37.5mM pH8.8，十二烷基磺酸钠 0.1%，过硫酸铵 0.1%，TEMED 0.04%，蛋白加样量 7ug，电泳条件 180v，100mA，35min(电泳液含 Tris25mM，甘氨酸 200mM，十二烷基磺酸钠 1%)；

(3) 转膜：转膜条件 100v，350mA，75min(转膜液含 Tris25mM，甘氨酸 200mM，甲醇 20%)将蛋白转至 PVDF 膜；

(4) 封闭：转膜结束后，将 PVDF 膜取出，用 7%脱脂奶 TPBS 液(TPBS 液含氯化钠 137mM，氯化钾 2.7mM，磷酸氢二钠 8mM，磷酸二氢钾 1.5mM，吐温 20 0.1%)封闭，4 度过夜；

(5) 抗体标记：将 PVDF 膜从脱脂奶中取出，用 TPBS 液洗膜两次 5min，标记一抗(抗人硫氧还蛋白抗体 1: 2000，TPBS 配制)，室温 75min，TPBS 液洗膜三次 5min 后再标记二抗(抗鼠 IgG 1: 5000，TPBS 配制)，室温 75min，TPBS 液洗膜三次 10min，两次 5min 后即可显影；

(6) 显影：加化学发光底物于 PVDF 膜上，马上在暗室中显影，将结果显示于胶片。

(7) 剥膜：显影后 PVDF 膜取出，与 10ml 剥膜缓冲液(巯基乙醇 2.7%，十二烷基磺酸钠 2%，Tris62.5mM)一起于 50 度孵育 30min，用 TPBS 洗膜两次 10min，然后用 10%脱脂奶的 TPBS 液封闭，4 度过夜；

(8) 抗体标记：将 PVDF 膜从脱脂奶中取出，用 TPBS 洗膜两次 5min，标记一抗(抗人 beta-actin 蛋白抗体 1: 10000，用 TPBS 液配制)，室温 75min，洗膜三次 5min 后再标记二抗(抗鼠 IgG 1: 5000，用 TPBS 液配制)，室温 75min，洗膜三次 10min，两次 5min 后即可显影；

(9) 显影：将化学发光底物于 PVDF 膜上，马上在暗室中显影，将结果显示于胶片。

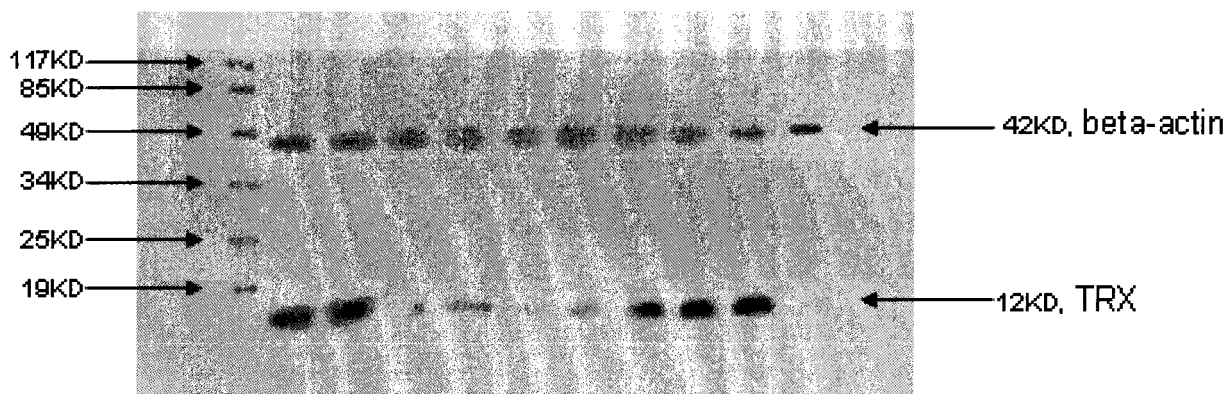


图 1

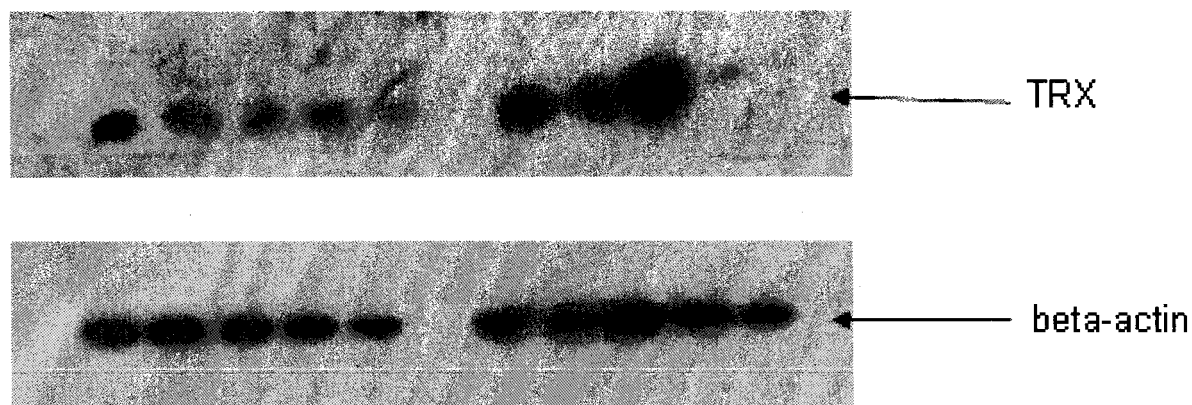


图 2

专利名称(译)	蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法		
公开(公告)号	CN101498718A	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200910094170.X	申请日	2009-03-09
[标]申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	昆明理工大学		
[标]发明人	白洁 王晟东 刘晓慧		
发明人	白洁 王晟东 刘晓慧		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了蛋白免疫印迹实验中两种抗体同时标记的方法，包括蛋白定量、聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗体标记、显影等步骤。该方法能在同一时间标记两种抗体，在一块PVDF膜同时标记抗人硫氧还蛋白抗体和抗人beta - actin抗体。本发明抗体标记方法的两种抗体互不影响，利用这两种抗体可以一次性标记同一块PVDF膜，显影后条带清晰，且提高了效率，减少了剥膜中的操作误差，增加了其可比性。

