



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110646335 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201910936753.6

(22)申请日 2019.09.29

(71)申请人 广东工业大学

地址 510060 广东省广州市越秀区东风东
路729号大院

(72)发明人 苗小敏 汤亚东 张焜 蓝兴梓
陈巧桐 陈家盈 梁大锡 罗竣仁

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

代理人 许庆胜

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/537(2006.01)

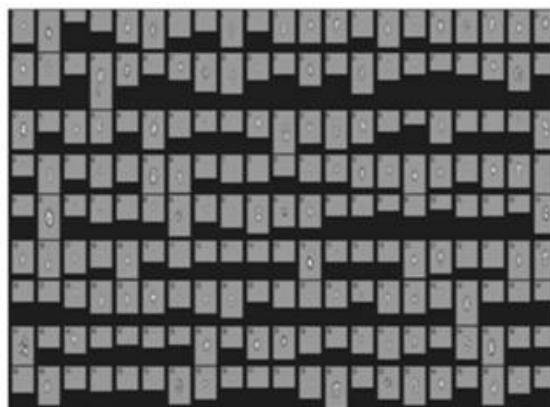
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

一种封闭液及其应用

(57)摘要

本发明涉及封闭液技术领域,尤其涉及一种封闭液及其应用。本发明公开了一种封闭液,包括:第一封闭液和第二封闭液;第一封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白和磷酸盐缓冲溶液;第二封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲溶液和聚乙二醇辛基苯基醚。本发明提供的封闭液有效减少了细胞表面FcR可以与荧光素偶联抗体的Fc段进行非特异性的结合,封闭效果好,使得流式细胞术的结果更加准确,且不易变质。



1. 一种封闭液,其特征在于,包括:第一封闭液和第二封闭液;
所述第一封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白和磷酸盐缓冲溶液;
所述第二封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲溶液和聚乙二醇辛基苯基醚。
2. 根据权利要求1所述的封闭液,其特征在于,所述吐温-20、所述驴血清、所述牛血清蛋白和所述磷酸盐缓冲溶液的用量比为:(10~100) μL : (500~5000) μL : (0.300~3.00) g: (9.490~94.90) mL。
3. 根据权利要求1所述的封闭液,其特征在于,所述吐温-20、所述驴血清、所述牛血清蛋白、所述磷酸盐缓冲溶液和所述聚乙二醇辛基苯基醚的用量比为:(10~100) μL : (500~5000) μL : (0.300~3.00) g: (9.390~93.90) mL: (100~1000) μL 。
4. 权利要求1至3任意一项所述的封闭液在抑制细胞表面Fab段与荧光素偶联抗体的Fc段非特异性的结合中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述细胞为心肌细胞、3T3、HaCat或hiPSC。
6. 权利要求1至3任意一项所述的封闭液在检测细胞蛋白中的应用,其特征在于,包括以下步骤:
将细胞固定后,采用第一封闭液封闭,然后采用含有一抗抗体的第二封闭液,形成第一复合物;
向所述第一复合物中加入含有二抗抗体的所述第二封闭液,形成第二复合物;
检测所述第二复合物。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述细胞为心肌细胞、3T3、HaCat或hiPSC。
8. 一种免疫荧光染色试剂盒,其特征在于,包括权利要求1至3任意一项所述的封闭液。
9. 一种流式细胞检测试剂盒,其特征在于,包括权利要求1至3任意一项所述的封闭液。
10. 一种蛋白免疫印迹试剂盒,其特征在于,包括权利要求1至3任意一项所述的封闭液。

一种封闭液及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及封闭液技术领域,尤其涉及一种封闭液及其应用。

背景技术

[0002] 流式细胞术是一种可以对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速的定量分析的分析技术。它可以高速分析上万个细胞,并能同时从一个细胞中测得多个参数,具有速度快、精度高、准确性好的优点,是当代最先进的细胞定量分析技术之一。利用流式细胞术对心肌细胞进行定量分析,可以得到人诱导多能干细胞(hiPSCs)分化成心肌细胞的数据信息,以了解心肌细胞的分化情况,为培养心肌细胞的后续工作提供了数据的支撑。

[0003] 在流式细胞术中标记样品细胞的荧光素偶联抗体多为单克隆抗体,少数也可能是多克隆抗体,其基本结构都由两部分组成,即包含有特异性结合抗原位点的Fab段和相对保守的Fc段,抗体的特异性表现在Fab段,标记时利用Fab段的抗原结合位点与细胞上抗原分子特异性结合,从而标记并且相对量化细胞表达该抗原分子的情况。但是,有些细胞表面表达FcR(Fc receptor,Fc受体),如巨噬细胞、DC、B淋巴细胞等,FcR可以与荧光素偶联抗体的Fc段进行非特异性的结合,对结果产生一定的影响。在流式细胞术中为了减少非特异性蛋白的结合通常会用到封闭液,传统的封闭液有脱脂牛奶、BSA等。封闭液的选择对结果的影响十分重要,选择适合的封闭液才能做出一张准确且清晰的荧光分析图。

[0004] 现有最常用的封闭液有脱脂奶粉以及BSA封闭液,BSA封闭液由牛血清蛋白配置而成,其价格昂贵,而且封闭的效果不佳,严重影响向实验成本。脱脂奶粉中主要起作用的成分是乳清蛋白和酪蛋白,成分比BSA复杂,其封闭的效果也比BSA好,但是脱脂奶粉容易发霉变质,甚至于脱脂奶粉脱脂不充分反而会使非特异性蛋白结合更多。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种封闭液及其应用,解决了现有的封闭液封闭效果不佳,易变质的问题。

[0006] 本发明提供了一种封闭液,包括:第一封闭液和第二封闭液;

[0007] 所述第一封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白和磷酸盐缓冲溶液;

[0008] 所述第二封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲溶液和聚乙二醇辛基苯基醚。

[0009] 优选地,所述吐温-20、所述驴血清、所述牛血清蛋白和所述磷酸盐缓冲溶液的用量比为:(10~100) μ L:(500~5000) μ L:(0.300~3.00)g:(9.490~94.90)mL,更优选为10 μ L:500 μ L:0.300g:9.490mL。

[0010] 优选地,所述吐温-20、所述驴血清、所述牛血清蛋白、所述磷酸盐缓冲溶液和所述聚乙二醇辛基苯基醚的用量比为:(10~100) μ L:(500~5000) μ L:(0.300~3.00)g:(9.390~93.90)mL:(100~1000) μ L,更优选为10 μ L:500 μ L:0.300g:9.390mL:100 μ L。

[0011] 封闭液可以本发明还提供了上述封闭液在抑制细胞表面Fab段与荧光素偶联抗体

的Fc段非特异性的结合中的应用。

[0012] 本发明中,所述细胞为心肌细胞、3T3、HaCat或hiPSC,更优选为心肌细胞。

[0013] 本发明还提供了上述封闭液在检测细胞蛋白中的应用,包括以下步骤:

[0014] 将细胞固定后,采用第一封闭液封闭,然后采用含有一抗抗体的第二封闭液,形成第一复合物;

[0015] 向所述第一复合物中加入含有二抗抗体的所述第二封闭液,形成第二复合物;

[0016] 检测所述第二复合物。

[0017] 本发明中,一抗抗体为细胞单克隆抗体,优选为心肌细胞单克隆抗体;二抗抗体为荧光素标记的羊抗鼠IgG。

[0018] 本发明中,含有一抗抗体的第二封闭液中,所述一抗抗体与所述第二封闭液的体积比为1:99;含有二抗抗体的所述第二封闭液中,所述二抗抗体与所述第二封闭液的体积比为1:999。

[0019] 本发明中,所述细胞为心肌细胞、3T3、HaCat或hiPSC,更优选为心肌细胞。

[0020] 本发明还提供了一种免疫荧光染色试剂盒,包括上述封闭液。

[0021] 本发明还提供了一种流式细胞检测试剂盒,包括上述封闭液。

[0022] 本发明流式细胞检测试剂盒还包括:固定液、心肌细胞单克隆抗体和荧光素标记的羊抗鼠IgG。

[0023] 本发明还提供了一种心肌细胞蛋白免疫印迹试剂盒,包括上述封闭液。

[0024] 本发明提供的免疫荧光染色试剂盒、流式细胞检测试剂盒和蛋白免疫印迹试剂盒除封闭液以外的试剂均为本领域技术人员熟知的试剂,本发明不做特殊限定。

[0025] 从以上技术方案可以看出,本发明具有以下优点:

[0026] 本发明提供了一种封闭液,包括:第一封闭液和第二封闭液;第一封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白和磷酸盐缓冲溶液;第二封闭液为:吐温-20、驴血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲溶液和聚乙二醇辛基苯基醚。

[0027] 本发明提供的封闭液有效减少了细胞表面FcR可以与荧光素偶联抗体的Fc段进行非特异性的结合,封闭效果好,使得流式细胞术的结果更加准确,且不易变质,节省了实验成本。

附图说明

[0028] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0029] 图1为本发明对比例1提供的心肌细胞流式细胞分布明场图;

[0030] 图2为本发明对比例1提供的心肌细胞流式细胞分布荧光图;

[0031] 图3为本发明对比例1提供的心肌细胞流式细胞分析图;

[0032] 图4为本发明实施例1提供的心肌细胞流式细胞分布明场图;

[0033] 图5为本发明实施例1提供的心肌细胞流式细胞分布荧光图;

[0034] 图6为本发明实施例1提供的心肌细胞流式细胞分析图。

具体实施方式

[0035] 为使得本发明的发明目的、特征、优点能够更加的明显和易懂,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,下面所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而非全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0036] 本发明实施例中,FlowBuffer-1:以10ml为例:10 μ l Tween-20、500 μ l donkey serum、0.300g BSA、9.490ml PBS;

[0037] FlowBuffer-2:以10ml为例:10 μ l Tween-20、500 μ l donkey serum、0.300g BSA、100 μ l Triton X-100、9.390ml PBS。

[0038] 本发明对比例中,FlowBuffer-1:以10ml为例:0.100g BSA、10.000ml PBS;

[0039] FlowBuffer-2:以10ml为例:0.300g BSA、100 μ l Triton X-100、9.900ml PBS。

[0040] 本发明实施例中,RPMI 1640基础培养基、2%的不含胰岛素的细胞培养添加剂B27,简称为RPMI1640+B27minus insulin。

[0041] 本发明实施例中所使用的试剂均为市购,其中,hiPSC具体为hiPSC-U1,购自北京赛贝有限公司,CA4002106;TeSR-E8培养基购自Stem Cell,cat.05990;RPMI 1640购自Gibco,11875;B 27minus insulin购自Gibco,A18956;B 27supplement购自Gibco,17504;甲醇购自天津市大茂化学试剂厂,2305;多聚甲醛购自meilunbio,MA0192;0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA购自Gibco,25200;FBS购自Gibco,A3160901;0.22 μ m滤膜购自MILLEX,SLGP033RB;Matrigel购自CORNING,354277;Triton X-100购自SLBW6818,SIGMA;一抗为心肌钙蛋白(cTnT),购自Abcam;二抗为Goat Anti-Mouse IgG H&L,购自Abcam;驴血清(donkey serum)购自北京索莱宝科技有限责任公司,SL050。

[0042] 实施例1

[0043] 本实施例为人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导分化为心肌细胞

[0044] 1.hiPSC-U1的培养方法:将Matrigel基质胶从-80 $^{\circ}$ C放入4 $^{\circ}$ C隔夜冻融,第二天将Matrigel分装并取100 μ l Matrigel加入10ml DMEM/F-12培养基于15ml离心管,存于4 $^{\circ}$ C冰箱内留以备用。每天,每孔换新培养基:4ml TeSR-E8培养基,直到hiPSCs数量达到75%左右。

[0045] 2.分化第0天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml (12 μ M CHIR99021+RPMI/B-27minus insulin)培养基,将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0046] 3.分化第1天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml RPMI/B-27培养基(不含胰岛素),将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0047] 4.分化第3天,加入CHIR 99021后72h。以一个孔为例,用15ml移液管从孔中收集2ml旧的培养基制备组合培养基配置方法:将2ml旧的培养基与2ml (RPMI/B-27minus insulin)混合。将4 μ l (5mM IWP 2)加入4ml组合培养基中。在弃掉剩余2ml培养基之前,轻轻地来回摇动平板以使细胞碎片悬浮,确保通过抽吸丢弃细胞碎片。每孔加入4ml含有IWP 2的组合培养基。重复操作以更换其他几个孔的培养基。

[0048] 5.分化第5天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml (RPMI/B-27minus insulin)培养基,将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0049] 6.在分化的第7天和之后的每3天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml RPMI/B-27

培养基,将多孔板放回37℃,5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0050] 实施例2

[0051] 本实施例为施例1心肌细胞的免疫荧光染色

[0052] (1) 消化:

[0053] 吸掉旧的培养基,每孔用2ml PBS清洗分化细胞,清洗两次。吸去PBS,加2ml的(0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA)解离酶解离细胞,在37℃,5%培养箱消化5min。

[0054] (2) 过滤细胞:

[0055] 利用1ml移液枪吹打5-10次,以使细胞单一化。然后将吹打单一的细胞悬液转移到一个含有4ml RPMI 20的15ml离心管,并用70μm细胞筛依靠重力作用自然过滤细胞。

[0056] (4) 计数:

[0057] 取10μl的细胞悬液用血球计数器计数细胞;并将细胞悬液以1000r/min的速度,室温下离心4min。离心后,利用1ml移液枪弃掉上清液。

[0058] (5) 细胞固定:

[0059] 离心弃掉旧的培养基后,加入1ml 4% (体积/体积) 多聚甲醛重悬细胞沉淀,然后在室温下孵育15min。

[0060] (6) 细胞封闭:

[0061] 将 1×10^6 个细胞加入含有2ml FlowBuffer-1的15ml离心管中,在室温下以200g的速度离心5min,弃掉上清液。重复清洗2次。

[0062] (7) 孵育一抗抗体:

[0063] 按照cTnT:FlowBuffer-2=1μl:99μl的体积比例配置,将细胞沉淀重悬于FlowBuffer-2稀释的100μl一抗抗体加入细胞沉淀中,并吹打均匀,将混合物在室温下孵育1h或4℃下孵育过夜。

[0064] (8) 孵育二抗抗体:

[0065] 将2ml FlowBuffer-2洗涤细胞,按照Goat Anti-Mouse IgG H&L:FlowBuffer-2=1μl:999μl的体积比例配置,并将细胞沉淀重悬于100μl含有二抗的FlowBuffer-2中,其中,得到混合物。将混合物在室温下在黑暗中孵育30min。

[0066] 对比例1

[0067] 本对比例为实施例1心肌细胞的免疫荧光染色

[0068] 本对比例与实施例2的区别在于:FlowBuffer-1:0.020g BSA、2.000ml PBS; FlowBuffer-2:0.020g BSA、20μl Triton X-100、1.980ml PBS。

[0069] 实施例3

[0070] 本实施例对实施例2和对比例1免疫荧光染色后的心肌细胞进行流式细胞分析。

[0071] 将实施例2和对比例1孵育的心肌细胞用分别用2ml FlowBuffer-2洗涤心肌细胞两次;将细胞沉淀重悬于50μl FlowBuffer-1中,并将其转移至流动的圆底管中。将流量管置于冰上并用FACS Calibur进行流式细胞分析。结果如图1~6。

[0072] 由图1~3和图4~6对比分析可知:对比例1封闭液射门得到的细胞偏少量,而且荧光检测值偏低,那么实验所需细胞量就会偏离实验理论值;实施例2封闭液射门得到的细胞较多,与预期实验理论值相差不大,近似接近相应细胞密度。

[0073] 以上所述,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前

述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

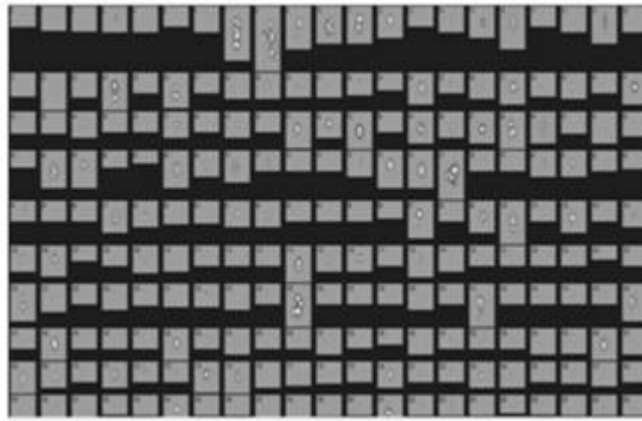


图1

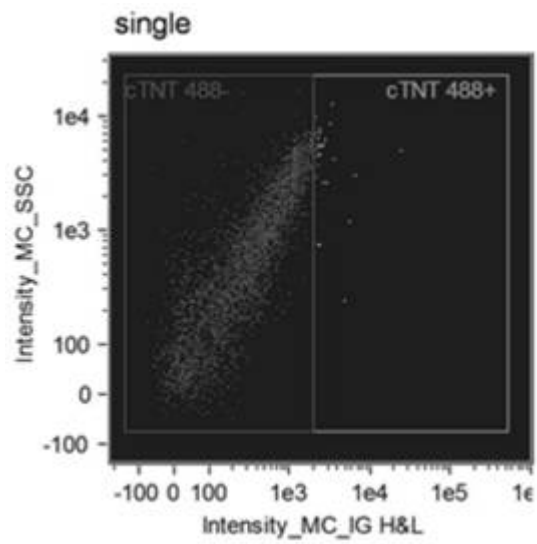


图2

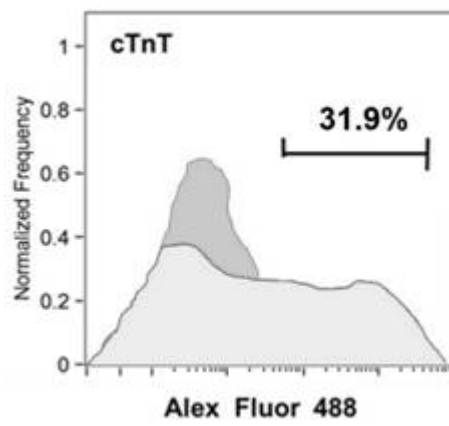


图3

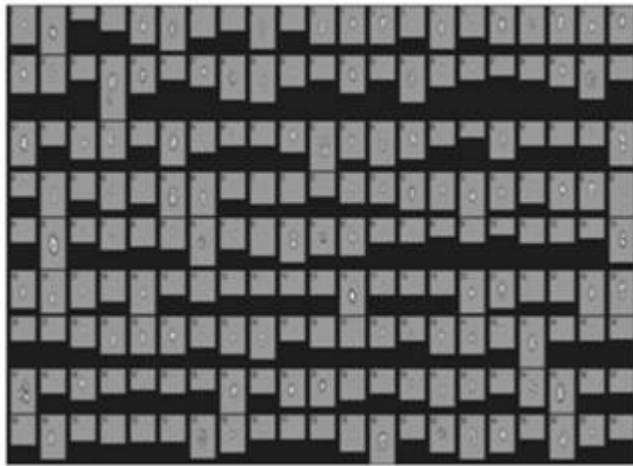


图4

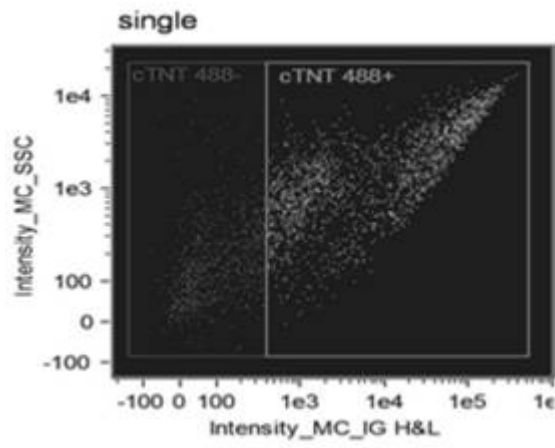


图5

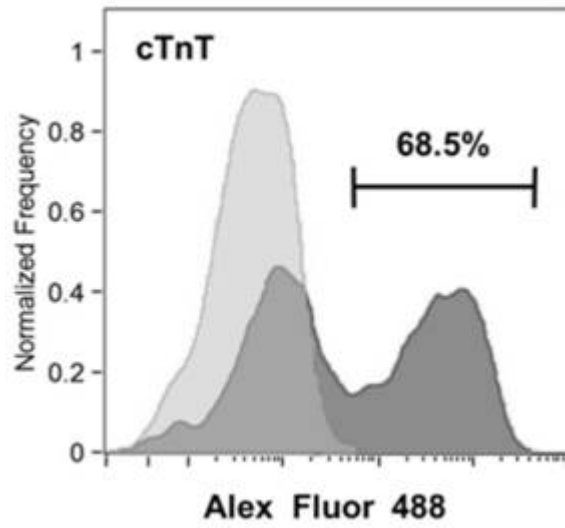


图6

专利名称(译)	一种封闭液及其应用		
公开(公告)号	CN110646335A	公开(公告)日	2020-01-03
申请号	CN201910936753.6	申请日	2019-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	苗小敏 汤亚东 张焜 蓝兴梓		
发明人	苗小敏 汤亚东 张焜 蓝兴梓 陈巧桐 陈家盈 梁大锡 罗竣仁		
IPC分类号	G01N15/14 G01N21/64 G01N33/533 G01N33/537		
CPC分类号	G01N15/1436 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/537 G01N2015/144 G01N2021/6439		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及封闭液技术领域，尤其涉及一种封闭液及其应用。本发明公开了一种封闭液，包括：第一封闭液和第二封闭液；第一封闭液为：吐温-20、驴血清、牛血清蛋白和磷酸盐缓冲溶液；第二封闭液为：吐温-20、驴血清、牛血清蛋白、磷酸盐缓冲溶液和聚乙二醇辛基苯基醚。本发明提供的封闭液有效减少了细胞表面FcR可以与荧光素偶联抗体的Fc段进行非特异性的结合，封闭效果好，使得流式细胞术的结果更加准确，且不易变质。

