

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910094169.7

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101498734A

[22] 申请日 2009.3.9  
[21] 申请号 200910094169.7  
[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 冯月梅 李 奎

[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 4 页 附图 1 页

[54] 发明名称

同时转两张膜,同时标记蛋白 TRX 和 pro-caspase12 的方法

[57] 摘要

本发明是一种同时转两张膜,标记两种蛋白 TRX 和 procaspase12 的方法,包括细胞总蛋白的提取、蛋白定量、凝胶电泳、蛋白印迹、抗体的同时标记以及 X 光片显影等步骤。旨在通过建立一种细胞中的总蛋白在经过 SDS - PAGE 和蛋白印迹后,将两张 PVDF 膜用于对两种目的蛋白,使用不同抗体同时标记同时检测的方法,同时还将该方法与传统的剥膜再标记抗体的方法相比较,对这种方法的准确性,重复性和稳定性等方面进行评价。本发明简单易行,并且实验结果能够得到很好的重现,为多种蛋白检测提供了一种更为简单易行,既节约时间和又节约样品方法,具有实际应用价值。

1、一种同时转2张膜，同时标记蛋白TRX和procaspase12的方法，其特征在于：两张膜分别标记蛋白TRX和procaspase12，包括细胞总蛋白的提取、蛋白定量、凝胶电泳、蛋白印迹、抗体的标记以及X光片显影步骤。

2、如权利要求1所述的方法，其特征在于：提取细胞总蛋白，经蛋白定量后进行凝胶电泳；蛋白经凝胶电泳后，将两张同样大小的PVDF膜重叠放在胶上，做好标记以便区分，转膜条件为：U=100V，I=350mA，T=70min；将两张膜分别标记TRX和procaspase12的抗体，进行免疫学检测，X光片显影检测结果。

3、如权利要求1所述的方法，其特征在于两种抗体的稀释比例分别为：TRX 1:5000，procaspase12 1:800。

4、如权利要求1所述的方法，其特征在于提取PC12细胞总蛋白，利用BCA法对细胞总蛋白定量；将细胞中提取的总蛋白进行凝胶电泳；用湿转法将胶上的蛋白同时转移至两张PVDF膜上；一抗标记，抗原抗体孵育70min后用TPBS洗膜；二抗标记，用辣根过氧化物酶二抗与抗原抗体复合物孵育70min后用TPBS洗膜；加入化学发光底物显影，得到两种目的蛋白的条带；通过传统的剥膜方法检验本方法的重复性和稳定性。

## 同时转两张膜，同时标记蛋白 TRX 和 procaspase12 的方法

### 技术领域

本发明属于分子生物学领域，涉及同时转两张膜，标记蛋白 TRX 和 procaspase12 的方法，从而检测两种目的蛋白的变化情况。

### 背景技术

蛋白免疫印迹（Western Blot）是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法。

western blot 是在凝胶电泳和固相免疫测定技术基础上发展起来的一种新的免疫生化技术，主要包括凝胶电泳，蛋白印迹（转膜）和免疫学检测三部分。

凝胶电泳是将待测样品中的蛋白质根据分子量大小在凝胶中分成条带。蛋白印迹是指将凝胶电泳分离的蛋白质样品转移到固相载体（例如硝酸纤维素薄膜或 PVDF 膜）上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其生物学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与酶标二抗起反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特异性目的基因表达的蛋白成分。

目前，凝胶电泳技术已应用于检测蛋白水平的表达。但现有技术中未见有同时转两张膜，标记蛋白 TRX 和 procaspase12 的方法的报道。

### 发明内容：

本发明旨在通过建立一种细胞中的总蛋白在经过 SDS-PAGE 和蛋白印迹后，将两张 PVDF 膜上的两种目的蛋白用不同抗体同时标记同时检测的方法。并将该方法与传统的剥膜再标记抗体的方法相比较，对这种方法的准确性，重复性和稳定性等方面进行评价，为多种蛋白检测提供了一种简单易行的方法，即节约时间又节约样品，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：

一次转两张膜，同时标记蛋白 TRX 和 procaspase12 的方法，包括细胞总蛋白的提取、蛋白定量、凝胶电泳、蛋白印迹、抗体的同时标记以及 X 光片显影步骤。

具体地，提取细胞总蛋白，经蛋白定量后进行凝胶电泳；蛋白经凝胶电泳后，将两张同样大小的 PVDF 膜重叠放在胶上，做好标记以便区分，转膜条件为：U=100V，I=350mA，T=70min；将两张膜分别标记 TRX 和 procaspase12 的抗体，进行免疫学检测，X 光片显影检测结果。

其中，两种抗体的稀释比例分别为：TRX 1:5000，procaspase12 1:800。

更具体地，提取 PC12 细胞总蛋白，利用 BCA 法对细胞总蛋白定量；将细胞中提取的总蛋白进行凝胶电泳；用湿转法将胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上；一抗标记，抗原抗体孵育 70min 后用 TPBS 洗膜；二抗标记，用辣根过氧化物酶二抗与抗原抗体复合物孵育 70min 后用 TPBS 洗膜；加入化学发光底物显影，得到两种目的蛋白的条带；通过传统的剥膜方法检验本方法的重复性和稳定性。

本发明的蛋白免疫印迹中同时转两张膜标记两种抗体方法的建立，内容包括以下几个步骤：

- A. 本发明以 PC12 细胞为例，提取 PC12 细胞总蛋白，利用 BCA 法对细胞总蛋白定量。
- B. 将细胞中提取的总蛋白进行凝胶电泳。
- C. 用湿转法将胶上的蛋白转移至两张 PVDF 膜上。
- D. 一抗标记，抗原抗体孵育 70min 后用 TPBS 洗膜。
- E. 二抗标记，用辣根过氧化物酶二抗与抗原抗体复合物孵育 70min 后用 TPBS 洗膜。
- F. 加入化学发光底物显影，两张膜上可得到两种目的蛋白的条带。
- G. 检测与传统的剥膜方法相比，该技术的重复性和稳定性。

附图说明：

图1为一块胶同时转两张膜检测 TRX 和 procaspase12 的目的条带;

图2为用传统的剥膜, 标记抗体得到的 TRX 和再 procaspase 12 的显影结果。

### 具体实施方式:

下面结合实施例, 进一步阐述本发明, 但不以此来限定本发明。

#### 实施例 1:

一块胶转两张 PVDF 膜, 同时标记两种抗体:

(1) 提取细胞总蛋白: 药物刺激 PC12 细胞 24h 后弃掉培养基, 加入 2ml 左右 PBS 冲洗细胞表面残留的培养基, 弃掉洗液。加入 0.25% 胰酶消化 5min 左右终止消化, 1500rpm 离心 5min, 弃掉上清, 加入 1ml PBS 悬浮细胞, 1500rpm 4℃ 离心 5min, 弃掉上清, 加入 100  $\mu$ l 细胞裂解液, 冰上裂解 1h 左右, 15000rpm 4℃ 离心 15 分钟, 将上清 (细胞总蛋白) 转移至新的 dorf 管中, -80℃ 保存。

(2) 蛋白质定量: 按 BCA 蛋白质定量试剂盒操作说明操作, 测定样品浓度。

(3) 电泳: 将提取出来的细胞总蛋白经 95℃ 热变性后进行变性聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳 (SDS-PAGE)。15% 分离胶 10ml: 无菌水 2.3ml, 30% 聚丙烯酰胺 5.0ml, Tris (PH=8.8, 1.5M) 2.5ml, 10% SDS 0.1ml, 10% APS 0.1ml, TEMED 4  $\mu$ l。压缩胶 4ml: 无菌水 2.7ml, 30% 聚丙烯酰胺 0.67ml, Tris (PH=6.8, 1.0M) 0.5ml, 10% SDS 40  $\mu$ l, 10% APS 40  $\mu$ l, TEMED 4  $\mu$ l。将准备好的样品液和预染蛋白 marker 分别上样, 电泳分离蛋白。电泳条件: U=180V, I=100mA, T=40min。电泳完成后进行转膜。

(4) 转膜: 由于经过电泳的胶上的蛋白全部带上了负电荷, 并且是恒流转膜, 因此转至膜上的蛋白是均匀的, 而且转至第一张膜上和第二张膜上的蛋白与总蛋白的比例都是一样的, 故按照负极-棉-三层滤纸-胶-两张 PVDF 膜-三层滤纸-棉-正极的顺序进行转膜, 转膜条件: U=100V, I=350mA, T=70min。冰水中进行。

(5) 封闭：将转好的两张 PVDF 膜用 5%脱脂奶封闭过夜，为第二天的抗原抗体标记做准备。

(6) 一抗标记：将封闭过夜的两张 PVDF 膜从 5%脱脂奶中取出，用 TPBS 清洗三次 5min，标记一抗，两张 PVDF 膜分别标记不同的一抗，本发明以 TRX 和 procaspase12 为例，TRX 1: 5000 稀释，procaspase12 1: 800 稀释。一抗标记 70min。

(7) 二抗标记：一抗标记完成之后，用 TPBS 洗三次 5min，开始二抗标记。本发明的 TRX 和 procaspase12 的二抗均为羊抗兔，稀释倍数为 1:5000。二抗标记 70min。

(8) X 光片显影：二抗标记完成之后，用 TPBS 洗三次 10min，三次 5min，加入 millipore 化学发光底物 (1ml/10cm<sup>2</sup>)，在暗室中进行显影。

## 实施例 2:

检测实施例的方法的准确性和稳定性:

利用传统的剥膜方法进行两种不同抗体的标记，从而检测本发明的准确性。

具体方法如下:

(1) 将已经在 X 光片上显影的标记了 TRX 抗体的 PVDF 膜加入 10ml 剥膜液 ( $\beta$ -巯基乙醇 0.27ml, 10%SDS 2ml, 1.0M Tris 6.8 625  $\mu$ l), 60 °C 孵育 30min, 用 TBPS 清洗三次 10min, 然后放入 5%脱脂奶 4°C 封闭过夜。

(2) 将膜从脱脂奶中取出, 用 TPBS 清洗三次 10min, 标记 procaspase12 一抗, 孵育 70min。

(3) 一抗标记完之后, 用 TPBS 清洗三次 5min, 标记二抗, 孵育 70min。

(4) 二抗标记完成之后, 用 TPBS 清洗三次 10min, 三次 5min, 加入化学发光底物, X 光片显影。

实施例 1 和实施例 2 的结果相同, 实验结果得到了很好的重现性。



图 1

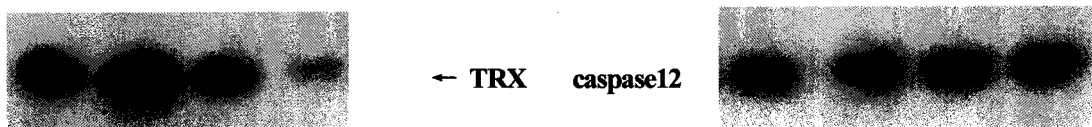


图 2

专利名称(译)	同时转两张膜,同时标记蛋白TRX和procaspase12的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101498734A</a>	公开(公告)日	2009-08-05
申请号	CN200910094169.7	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 冯月梅 李奎		
发明人	白洁 冯月梅 李奎		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明是一种同时转两张膜，标记两种蛋白TRX和procaspase12的方法，包括细胞总蛋白的提取、蛋白定量、凝胶电泳、蛋白印迹、抗体的同时标记以及X光片显影等步骤。旨在通过建立一种细胞中的总蛋白在经过SDS - PAGE和蛋白印迹后，将两张PVDF膜用于对两种目的蛋白，使用不同抗体同时标记同时检测的方法，同时还将该方法与传统的剥膜再标记抗体的方法相比较，对这种方法的准确性，重复性和稳定性等方面进行评价。本发明简单易行，并且实验结果能够得到很好的重现，为多种蛋白检测提供了一种更为简单易行，既节约时间和又节约样品方法，具有实际应用价值。

