



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109085338 B

(45) 授权公告日 2021.07.13

(21) 申请号 201811067437.1

(22) 申请日 2018.09.13

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109085338 A

(43) 申请公布日 2018.12.25

(73) 专利权人 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

地址 430000 湖北省武汉市中国(湖北)自贸试验区武汉片区高新二路388号武汉光谷国际生物医药企业加速器一期工程厂房1单元808室

(72) 发明人 冷毅斌 张念元

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所(特殊普通合伙) 42242

代理人 廉海涛

(51) Int.Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101836117 A, 2010.09.15

CN 108414771 A, 2018.08.17

CN 108303528 A, 2018.07.20

CN 107219369 A, 2017.09.29

CN 103323448 A, 2013.09.25

CN 103597353 A, 2014.02.19

CN 102333886 A, 2012.01.25

审查员 李倩

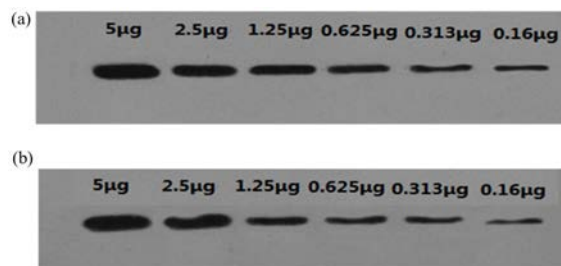
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

ECL底物液及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种ECL底物液及其制备方法和应用,该ECL底物液包括如下浓度的组分:鲁米诺0.15g/L-0.50g/L、1-溴-2-萘酚0.15g/L-0.50g/L、EDTA 0.15g/L-1.00g/L、过氧化脲0.03g/L-0.20g/L、聚乙二醇1.00g/L-5.00g/L、生物防腐剂0.05mL/L-0.50mL/L和pH 9.0的柠檬酸缓冲液0.2mol/L-0.6mol/L。该ECL底物液通过特定组分的复配形成用于蛋白免疫印迹检测的发光液,可以增强底物荧光,在蛋白质免疫印迹实验过程中能够最大程度地提高检测灵敏度,减少背景值,且热稳定性好,可以长期存放。



1. 一种ECL底物液在磷酸化P53蛋白免疫印记检测中的应用,其特征在于,所述ECL底物液包括如下浓度的组分:

鲁米诺	0.15 g/L -0.50 g/L,
1-溴-2-萘酚	0.15 g/L -0.50 g/L,
EDTA	0.15 g/L -1.00 g/L,
过氧化脲	0.03 g/L -0.20 g/L,
聚乙二醇	1.00 g/L -5.00 g/L,
生物防腐剂	0.05 mL /L -0.50 mL/L,以及
pH 9.0的柠檬酸缓冲液	0.2 mol/L -0.6 mol/L;

所述聚乙二醇的分子量为5000-8000,所述生物防腐剂为Proclin300。

2. 根据权利要求1所述ECL底物液在磷酸化P53蛋白免疫印记检测中的应用,其特征在于,所述ECL底物液包括如下浓度的组分:

鲁米诺	0.25 g/L -0.35 g/L,
1-溴-2-萘酚	0.25 g/L -0.35 g/L,
EDTA	0.40 g/L -0.60 g/L,
过氧化脲	0.05 g/L -0.15 g/L,
聚乙二醇	1.00 g/L -3.00 g/L,
生物防腐剂	0.10 mL /L -0.30 mL/L,以及
pH 9.0的柠檬酸缓冲液	0.30mol/L -0.50 mol/L。

3. 根据权利要求2所述ECL底物液在磷酸化P53蛋白免疫印记检测中的应用,其特征在于,所述ECL底物液包括如下浓度的组分:

鲁米诺	0.30 g/L,
1-溴-2-萘酚	0.28 g/L,
EDTA	0.50g/L,
过氧化脲	0.10 g/L,
聚乙二醇	2.00g/L,
生物防腐剂	0.20mL/L,以及
pH 9.0的柠檬酸缓冲液	0.40mol/L。

4. 根据权利要求1至3任一项所述ECL底物液在磷酸化P53蛋白免疫印记检测中的应用,其特征在于,所述ECL底物液的制备方法包括如下步骤:

按照权利要求1至3任一项所述的ECL底物液的组成称量各组分;

将鲁米诺、1-溴-2-萘酚、EDTA、过氧化脲和聚乙二醇用水溶解,再加入生物防腐剂,定容,即得。

ECL底物液及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种ECL底物液及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫印迹法(Westernblotting,简称“WB”)是一种将高分辨率凝胶电泳和免疫化学分析技术相结合的杂交技术。免疫印迹法具有分析容量大、敏感度高、特异性强等优点,是检测蛋白质特性、表达与分布的一种最常用的方法,如组织抗原的定性定量检测、多肽分子的质量测定及病毒的抗体或抗原检测等。

[0003] 蛋白质磷酸化指由蛋白质激酶催化的把三磷酸腺苷(ATP)的磷酸基转移到底物蛋白质氨基酸残基(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸)上的过程,或者在信号作用下结合鸟苷三磷酸(GTP),是生物体内一种普通的调节方式,在细胞信号转导的过程中起重要作用。蛋白质磷酸化是调节和控制蛋白质活力和功能的最基本、最普遍,也是最重要的机制。

[0004] p53是一种肿瘤抑制蛋白,在细胞对DNA损伤或基因组异常响应过程中起关键作用。p53激活可以导致细胞周期阻滞(cell cycle arrest),DNA修复或细胞凋亡。MDM2蛋白是p53的E3泛素连接酶(E3ligase),可以导致p53的泛素化修饰并被蛋白酶体降解。p53可以被多种蛋白激酶在多个位点磷酸化修饰。DNA损伤诱导的p53Ser15和Ser20磷酸化可以减弱p53和其负调控因子MDM2蛋白的结合。p53可以被ATM、ATR和DNA-PK等在Ser15和Ser37位磷酸化,从而抑制p53的泛素化降解,促进p53的激活和积累。Chk1和Chk2可以磷酸化p53的Ser20,促进p53的四聚化,增强其稳定性和活性。p53的Ser46磷酸化和其诱导细胞凋亡密切相关。p53的Ser392可以被CAK磷酸化,该位点磷酸化和p53的抑制生长功能及其DNA结合和转录激活有关。p53可以被p300和CBP乙酰化修饰,可以被Sirt1去乙酰化修饰。p53的乙酰化修饰可以促进其在应激反应中的累积和激活。

[0005] 目前WB检测过程中,当底物发生化学反应产生的能量以光的形式释放出来的时候,我们称这个过程为化学发光。鲁米诺是最常用的化学发光试剂之一,被过氧化物氧化后它会产生一种激发态的产物。这种激发态产物衰变至低能态的同时会释放出光子。然而,磷酸化蛋白的含量比较低,在WB检测过程中经常会遇到采用常规鲁米诺底物液时表达丰度低导致检测不出来的情况,这个主要原因是使用常规鲁米诺底物液的灵敏度比较低,并且现在没有特异性针对磷酸化蛋白检测中的应用。也就是常规的ECL底物液灵敏度较低,在磷酸化抗体的检测上不能达到良好的效果。

发明内容

[0006] 基于此,有必要针对提供一种能够提高磷酸化蛋白检测灵敏度的ECL底物液及其制备方法和应用。

[0007] 一种ECL底物液,包括如下浓度的组分:

- | | | |
|--------|--|---------------------------|
| | 鲁米诺 | 0.15 g/L -0.50 g/L, |
| | 1-溴-2-萘酚 | 0.15 g/L -0.50 g/L, |
| | EDTA | 0.15 g/L -1.00 g/L, |
| [0008] | 过氧化脲 | 0.03 g/L -0.20 g/L, |
| | 聚乙二醇 | 1.00 g/L -5.00 g/L, |
| | 生物防腐剂 | 0.05 mL /L -0.50 mL/L, 以及 |
| | pH 9.0 的柠檬酸缓冲液 | 0.2 mol/L -0.6 mol/L。 |
| [0009] | 在其中一个实施例中,所述的ECL底物液包括如下浓度的组分: | |
| | 鲁米诺 | 0.25 g/L -0.35 g/L, |
| | 1-溴-2-萘酚 | 0.25 g/L -0.35 g/L, |
| | EDTA | 0.40 g/L -0.60 g/L, |
| [0010] | 过氧化脲 | 0.05 g/L -0.15 g/L, |
| | 聚乙二醇 | 1.00 g/L -3.00 g/L, |
| | 生物防腐剂 | 0.10 mL /L -0.30 mL/L, 以及 |
| | pH 9.0 的柠檬酸缓冲液 | 0.30mol/L -0.50 mol/L。 |
| [0011] | 在其中一个实施例中,所述的ECL底物液包括如下浓度的组分: | |
| | 鲁米诺 | 0.30 g/L, |
| | 1-溴-2-萘酚 | 0.28 g/L, |
| | EDTA | 0.50g/L, |
| [0012] | 过氧化脲 | 0.10 g/L, |
| | 聚乙二醇 | 2.00g/L, |
| | 生物防腐剂 | 0.20mL/L, 以及 |
| | pH 9.0 的柠檬酸缓冲液 | 0.40mol/L。 |
| [0013] | 在其中一个实施例中,所述聚乙二醇的分子量为1000-20000。 | |
| [0014] | 在其中一个实施例中,所述聚乙二醇的分子量为5000-8000。 | |
| [0015] | 在其中一个实施例中,所述生物防腐剂为Proclin300。 | |
| [0016] | 一种上述任一项所述的ECL底物液的制备方法,包括如下步骤: | |
| [0017] | 按照上述任一项所述的ECL底物液的组成称量各组分; | |
| [0018] | 将鲁米诺、1-溴-2-萘酚、EDTA、过氧化脲和聚乙二醇用水溶解,再加入生物防腐剂,定容,即得。 | |
| [0019] | 上述任一项所述的ECL底物液在蛋白免疫印记检测中的应用。 | |

[0020] 在其中一个实施例中,所述蛋白免疫印记检测的蛋白质为磷酸化蛋白。

[0021] 在其中一个实施例中,所述磷酸化蛋白为磷酸化P53蛋白。

[0022] 本发明的有益效果是:

[0023] 上述ECL底物液通过特定组分的复配形成用于蛋白免疫印迹检测的发光液,可以增强底物荧光,在蛋白质免疫印迹实验过程中能够最大程度地提高检测灵敏度,减少背景值。同时上述ECL底物液是单一溶液,容易配制、成本低。另外,上述ECL底物液的热稳定性好,可以长期存放。

附图说明

[0024] 图1为实施例2和实施例3的WB检测磷酸化p53的曝光结果图;其中,图1a为实施例2的曝光结果图,图1b为实施例3的曝光结果图;

[0025] 图2为热稳定性试验的曝光结果图;其中,图2a为将ECL底物液放置0天时测试曝光结果图,图2b为将ECL底物液放置7天时测试曝光结果图,图2c为将ECL底物液放置14天时测试曝光结果图。

具体实施方式

[0026] 为了便于理解本发明,下面对本发明进行更全面的描述但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0027] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0028] 实施例1

[0029] 本实施例提供一种ECL底物液,包括以下浓度的组分:0.30g/L的鲁米诺、0.28g/L的1-溴-2-萘酚、0.50g/L的EDTA、0.10g/L的过氧化脲、2.00g/L的聚乙二醇6000、0.20mL/L的Proclin300和0.40mol/L的pH 9.0的柠檬酸缓冲液。

[0030] 本实施例的ECL底物液的制备方法包括如下步骤:

[0031] 准备工作:1000mL量筒、1000mL容量瓶均用自来水清洗干净,搅拌子冲洗干净备用,分析天平调平并预热20min,pH计校准。

[0032] 使用称量纸在分析天平上准确称取5.5g柠檬酸,缓慢倒入烘干后1000mL烧杯中。

[0033] 使用称量纸在分析天平上准确称取14.5g柠檬酸钠,缓慢倒入上述烘干后的1000mL烧杯中。

[0034] 使用称量纸在分析天平上准确称取0.30g鲁米诺,缓慢倒入上述烘干后的1000mL烧杯中。

[0035] 使用称量纸在分析天平上准确称取0.28g 1-溴-2-萘酚,缓慢倒入上述烘干后的1000mL烧杯中。

[0036] 使用称量纸在分析天平上准确称取0.50g EDTA,缓慢倒入上述烘干后的1000mL烧杯中。

[0037] 使用称量纸在分析天平上准确称取2.00g聚乙二醇6000,缓慢倒入上述烘干后的

1000mL烧杯中。

[0038] 使用洗净的1000mL量筒量取800mL纯净水加入上述烘干后的1000mL烧杯中,将1000mL烧杯置于搅拌器上,打开磁力搅拌器开始搅拌。待固体完全溶解后,再搅拌15min,得第一混合液。

[0039] 使用1mL移液枪分两次缓慢向第一混合液种加入200 μ L的Proclin300,搅拌15min,得第二混合液。

[0040] 将第二混合液转移至容量瓶内,加入纯净水,定容至1000mL。反复颠倒容量瓶10次以上,使溶液充分混合均匀,然后将混匀的溶液倒入1000mL烧杯中,即得ECL底物液。

[0041] 实施例2

[0042] 将实施例1中制备获得的ECL底物液应用于WB检测磷酸化P53,具体步骤如下:

[0043] S1,细胞处理:

[0044] 将HCT116 cell lysate细胞培养物置于培养皿上,培养皿的下面放冰。用冰的(指的温度范围为0~4 $^{\circ}$ C,下同)PBS溶液洗涤HCT116 cell lysate细胞培养物。吸除PBS溶液,然后加入冰的裂解缓冲液。

[0045] 用一个冰的塑料细胞刮除器从培养皿上刮下裂解后的细胞,置于4 $^{\circ}$ C条件下持续的搅拌30min。再在4 $^{\circ}$ C条件下进行离心(不同的细胞裂解需要不同的离心力和时间)。轻轻地把离心管从离心机上拿下来,吸取上清液,转移至预冷的新离心管中,并除去颗粒状物质,得裂解液。

[0046] S2,用BCA法测标准曲线,计算上样量:

[0047] 制作标准曲线:分别通过BSA蛋白标准品制备0mg/mL、0.20mg/mL、0.40mg/mL、0.60mg/mL、0.80mg/mL、1.0mg/mL的BSA磷酸水溶液,稀释BSA蛋白标准品,测试吸光度值,获取标准曲线。

[0048] 计算上样量:测试裂解液的吸光度值,根据标准曲线计算待测样本的上样量。

[0049] 若是细胞裂解液或组织匀浆液,计算待测样本的上样量需含总蛋白的质量为20 μ g-30 μ g,纯化后的待测样本需含10ng-100ng蛋白。

[0050] S3,样本预处理:

[0051] 根据上述上样量要求计算需要稀释的比例和加入沉降缓冲液的量,对裂解液进行还原和变性裂解物:在100 $^{\circ}$ C下煮样5min。

[0052] S4,电泳:

[0053] 将配好的胶置于电泳液中,每个样品按照计算的上样量上样,上样时要注意小心样本溶液从孔中溢出。

[0054] 具体参数如下:先在80V电压下恒压跑胶,待marker有分开的趋势后,调整电压至120V跑胶,根据实验要求marker分离合适后停止跑胶。

[0055] S5,转膜:

[0056] 先将PVDF膜置于甲醇中浸泡1min,后置于转移液中浸泡5min待用。把无纺纤维垫、滤纸、胶、PVDF膜、滤纸、无纺纤维垫按顺序在转印板阴极依次摆放好。150mA转膜,转膜时间根据试验情况进行优化。

[0057] 在其他实施例中,还可以采用NC膜进行转膜:NC膜与PVDF膜的不同之处在于NC膜不需要用甲醇进行浸泡(注:不需要也不能进行用甲醇等有脂溶性的溶液进行浸泡)。其他

步骤和PVDF膜一样。

[0058] 用封闭液室温下封闭1h。用封闭液最好的比例稀释抗体,把膜放入此封闭液中,4℃孵育过夜。封闭液中牛奶的浓度和抗体的比例根据试验情况可进行优化调整。

[0059] 用TBST洗膜三次,每次15min。再把膜放入用封闭液按一定比例稀释的酶连或荧光偶联的二抗溶液中,并在常温下孵育1h。

[0060] TBST洗膜三次,每次15min。

[0061] 放入WB显影仪中,加入实施例1制备获得的ECL底物液,使ECL底物液布满整块膜,进行曝光,结果见图1a和下表1。

[0062] 对比例1

[0063] 本对比例采用市售的进口Thermo ECL底物液应用于WB检测磷酸化P53,具体处理步骤与实施例2的样品处理步骤基本相同,区别在于:

[0064] 用进口Thermo ECL底物液代替实施例1制备获得的ECL底物液,放入WB显影仪中曝光的结果见图1b和下表1。

[0065] 表1本发明的ECL底物液与市售Thermo ECL底物液的结果比较

[0066]

上样量	实施例2	对比例1
5.00μg	1743451	133590
2.50μg	1347866	842589
1.25μg	845892	374584
0.625μg	478480	214578
0.313μg	257946	148942
0.16μg	168342	52574

[0067] 从表1、图1a和图1b可以看出,与对比例1相比,在相同蛋白上样量(5.00μg、2.50μg、1.25μg、0.625μg、0.313μg、0.16μg进行WB检测磷酸化P53)的情况下,实施例1制备的ECL底物液比市售Thermo ECL底物液的发光信号值更强,在浓度的相同情况下,更灵敏,更适合检测低浓度的抗体。

[0068] 另外,值得说明的是,经大量的试验探究,当ECL底物液中各组分的浓度范围如下时:鲁米诺0.1g/L-0.5g/L、1-溴-2-萘酚0.1g/L-0.5g/L、EDTA 0.1g/L-1g/L、过氧化脲0.03g/L-0.2g/L、聚乙二醇1g/L-5g/L、Proclin300 0.05mL/L-0.5mL/L、pH 9.0的柠檬酸缓冲液0.2mol/L-0.6mol/L,整体上均比市售Thermo ECL底物液的发光信号值强,更灵敏。其中,聚乙二醇的分子量范围可以为1000-20000,优选5000-8000。

[0069] 稳定性试验:

[0070] 热稳定性是检测检测ECL底物液重要的指标。使用实施例2的磷酸化P53抗体的WB检测方法对实施例1制备的ECL底物液的热稳定性进行评估,具体包括如下步骤:

[0071] 将实施例1制备的ECL底物液分别放置于37℃7天和14天,与放置于4℃的ECL底物液进行WB检测磷酸化P53的平行对比试验,对发光值进行对比,统计结果见图2和下表2,其中图2a为放置0天时的测试结果,图2b为放置7天时的测试结果,图2c为放置14天时的测试结果:

[0072] 表2热稳定性试验比较

测试时间	发光值	
	4℃	37℃
[0073] 0 天	1743451	1743590
7 天	1740784	1726539
14 天	1739751	1641702

[0074] 从以上表2及图2可以看出,本发明的ECL底物液有优异的热稳定性,14天的评估条件下,仍能够保存90%以上的活性,由此可以证明本发明的ECL底物液稳定性效果优异,可以长期存放。

[0075] 综上所述,本发明提供的ECL底物液是一种可以用在WB检测中的底物液,底物液中与鲁米诺复配的1-溴-2-萘酚、聚乙二醇等组分,可以特异性的增强底物荧光,可以有效降低信噪比,使用比较低的浓度时也可以到达比较高的信号值,从而提高检测灵敏度,解决了发光灵敏度及特异性检测磷酸化蛋白应用上的不足。尤其是,采用实施例1的浓度配比的ECL底物液的发光值更高,灵敏性最好。

[0076] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0077] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

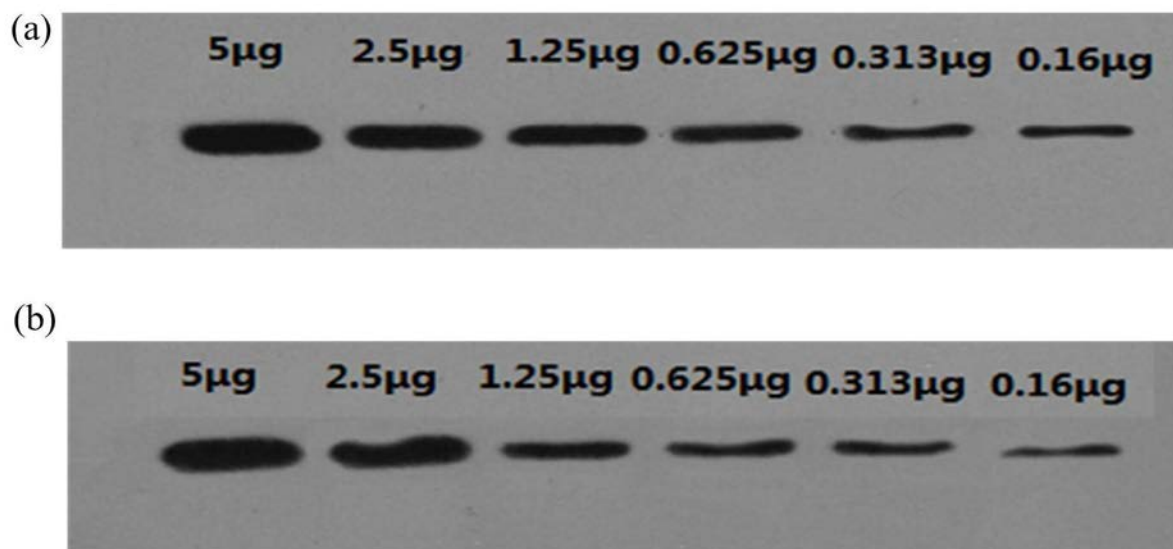


图1

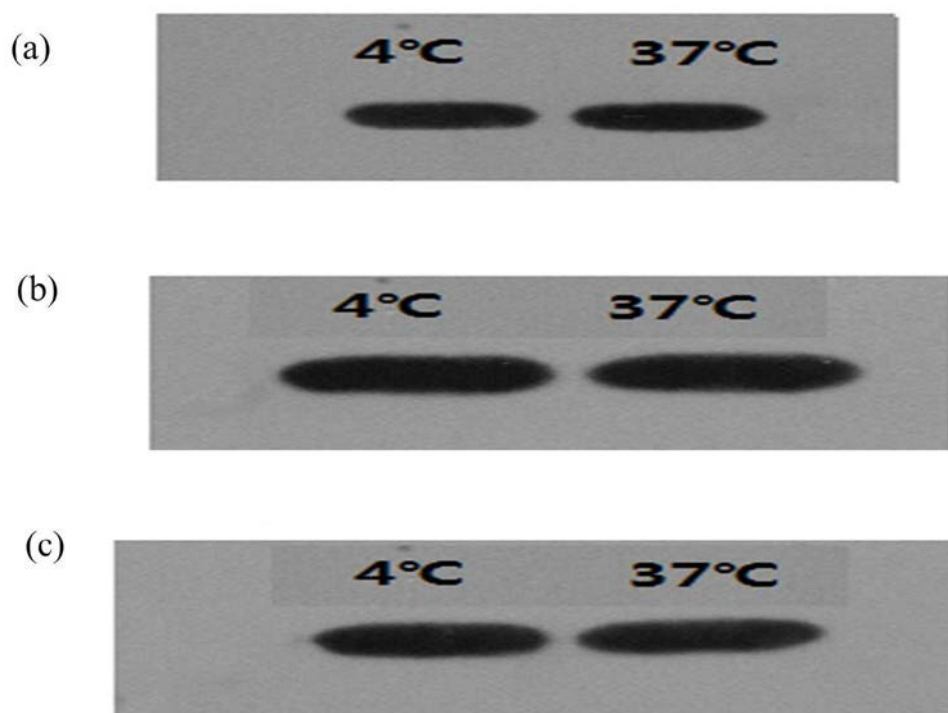


图2