



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110133287 B

(45) 授权公告日 2021.07.30

(21) 申请号 201910429247.8

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2019.05.22

G01N 33/535 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01R 33/48 (2006.01)

申请公布号 CN 110133287 A

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.08.16

(56) 对比文件

(73) 专利权人 上海碧云天生物技术有限公司

CN 101878023 A, 2010.11.03

地址 201600 上海市松江区新飞路1500弄
30号

US 2014298501 A1, 2014.10.02

WO 2018215780 A1, 2018.11.29

专利权人 江苏碧云天高新技术有限公司

CN 102167735 A, 2011.08.31

CN 106124599 A, 2016.11.16

CN 103304625 A, 2013.09.18

(72) 发明人 葛新建 陈幸苗

审查员 许珊萍

(74) 专利代理机构 南京利丰知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 32256

代理人 王锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

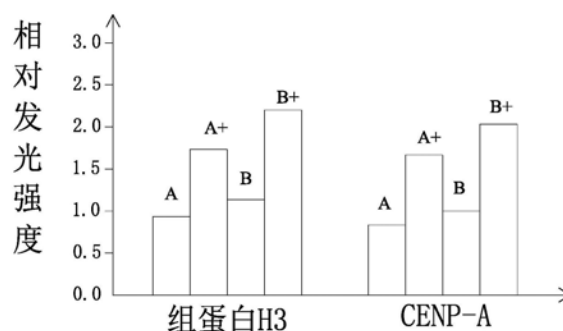
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

蛋白抽提溶液及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种蛋白抽提溶液及其应用, 所述蛋白抽提溶液包括缓冲试剂、去垢剂、盐、蛋白酶抑制剂及核酸酶, 所述核酸酶包括脱氧核糖核酸酶DNase、核糖核酸酶RNase、及同时具有脱氧核糖核酸酶DNase和核糖核酸酶RNase的酶中的一种或多种。本发明中的蛋白抽提溶液中通过添加核酸酶, 能够显著改善蛋白的抽提效果, 可适用于较难抽提的蛋白(如包括核酸结合蛋白), 并且具有成本低的优点。



1. 一种含脱氧核糖核酸酶DNase I和核糖核酸酶RNaseA的蛋白抽提溶液在组蛋白H3和CENP-A抽提中的应用,其特征在于,所述蛋白抽提溶液用纯水配置,所述蛋白抽提溶液的配方如下:

20mmol/L4-羟乙基哌嗪乙磺酸,pH 7.8;

100mmol/L氯化钠;

10mmol/L氯化钾;

1%乙基苯基聚乙二醇;

0.2%十二烷基硫酸钠;

0.002mmol/L天冬氨酸蛋白酶抑制剂;

0.2mg/mL核糖核酸酶RNaseA;

50U/ml重组脱氧核糖核酸酶DNase I。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述蛋白抽提溶液应用于蛋白浓度测定、ELISA检测、免疫印迹检测、蛋白电泳检测、蛋白层析检测、胶体金检测、核磁共振检测、质谱检测中对蛋白样品中蛋白的抽提。

蛋白抽提溶液及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物样品中蛋白检测技术领域,特别是涉及一种蛋白抽提溶液及其应用。

背景技术

[0002] 蛋白,也称蛋白质,是生物体的主要组成成分之一。不同的生物体,不同的组织和不同的细胞,包括不同的生理和病理状态,蛋白的具体组成和各种蛋白相对丰度是不同的。为了检测不同生物体、不同组织、不同的细胞,包括不同的生理和病理状态下,蛋白的具体组成和各种蛋白相对丰度,首先需要对组织、细胞等生物体的样品进行处理,以抽提获得蛋白。抽提获得的蛋白样品就可以用蛋白浓度测定、ELISA、免疫印迹、蛋白电泳、蛋白层析、胶体金、核磁共振、质谱等各种蛋白相关检测。

[0003] 组织、细胞等生物体样品的蛋白抽提的方法比较常见的是,采用特定的蛋白抽提溶液,随后直接抽提或通过匀浆、研磨等方式提高抽提效率;或者在先把样品通过匀浆、研磨等方式处理后,再加入特定的蛋白抽提溶液,随后直接抽提或通过匀浆、研磨等方式进一步提高抽提效率。

[0004] 现有技术中对于一些特定的难抽提的蛋白,包括一些核酸结合蛋白,抽提效果不太理想,抽提效率偏低,对于后续蛋白浓度测定、ELISA、免疫印迹、蛋白电泳、蛋白层析、胶体金、核磁共振、质谱等各种蛋白相关检测带来不便。

[0005] 因此,针对上述技术问题,有必要提供一种蛋白抽提溶液及其应用。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种蛋白抽提溶液及其应用。

[0007] 为了实现上述目的,本发明一实施例提供的技术方案如下:

[0008] 一种蛋白抽提溶液,所述蛋白抽提溶液包括缓冲试剂、去垢剂、盐、蛋白酶抑制剂及核酸酶,所述核酸酶包括脱氧核糖核酸酶DNase、核糖核酸酶RNase、及同时具有脱氧核糖核酸酶DNase和核糖核酸酶RNase的酶中的一种或多种。

[0009] 作为本发明的进一步改进,所述核酸酶为脱氧核糖核酸酶DNase,脱氧核糖核酸酶DNase为天然脱氧核糖核酸酶、重组脱氧核糖核酸酶中的一种或多种。

[0010] 作为本发明的进一步改进,所述脱氧核糖核酸酶DNase的浓度范围为0.1~10000U/mL或1~1000U/mL或10~100U/mL。

[0011] 作为本发明的进一步改进,所述核酸酶为核糖核酸酶RNase,核糖核酸酶RNase为核糖核酸酶A、核糖核酸酶T1中的一种或多种。

[0012] 作为本发明的进一步改进,所述核糖核酸酶RNase的浓度范围为0.001~50mg/mL或0.01~5mg/mL或0.05~0.5mg/mL。

[0013] 作为本发明的进一步改进,所述缓冲试剂包括三羟甲基氨基甲烷、4-羟乙基哌嗪乙磺酸中的一种或多种,缓冲试剂的浓度为10~100mmol/L,pH范围为7~8。

[0014] 作为本发明的进一步改进,所述去垢剂包括聚乙二醇辛基苯基醚、吐温20、乙基苯基聚乙二醇中的一种或多种,去垢剂的质量分数为0.1%~2%。

[0015] 作为本发明的进一步改进,所述盐包括氯化钠、氯化钾、醋酸钠中的一种或多种,盐的浓度范围为50~200mmol/L。

[0016] 作为本发明的进一步改进,所述蛋白酶抑制剂包括亮抑蛋白酶肽、天冬氨酸蛋白酶抑制剂中的一种或多种,蛋白酶抑制剂的浓度范围为0.001~0.2mmol/L。

[0017] 本发明一实施例提供的技术方案如下:

[0018] 一种蛋白抽提溶液的应用,所述蛋白抽提溶液为上述的蛋白抽提溶液,所述蛋白抽提溶液应用于蛋白浓度测定、ELISA检测、免疫印迹检测、蛋白电泳检测、蛋白层析检测、胶体金检测、核磁共振检测、质谱检测中对蛋白样品中蛋白的抽提。

[0019] 本发明的有益效果是:

[0020] 本发明中的蛋白抽提溶液中通过添加核酸酶,能够显著改善蛋白的抽提效果,可适用于较难抽提的蛋白(如包括核酸结合蛋白),并且具有成本低的优点;

[0021] 蛋白抽提溶液抽提的蛋白样品可以来源于不同的物种,可以是存活的细胞、组织和生物体,也可以是非存活的细胞、组织和生物体,应用面较为广阔;

[0022] 蛋白抽提溶液可广泛应用于蛋白浓度测定、ELISA检测、免疫印迹检测、蛋白电泳检测、蛋白层析检测、胶体金检测、核磁共振检测、质谱检测等。

附图说明

[0023] 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中记载的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0024] 图1为本发明中蛋白抽提溶液(A、A+、B、B+)通过ELISA检测到的组蛋白H3和CENP-A的相对发光强度的示意图。

具体实施方式

[0025] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明中的技术方案,下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。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他实施例,都应当属于本发明保护的范围。

[0026] 本发明公开了一种蛋白抽提溶液,包括缓冲试剂、去垢剂、盐、蛋白酶抑制剂及核酸酶,其中,核酸酶包括脱氧核糖核酸酶DNase、核糖核酸酶RNase、及同时具有脱氧核糖核酸酶DNase和核糖核酸酶RNase的酶中的一种或多种。

[0027] 当核酸酶为脱氧核糖核酸酶DNase时,脱氧核糖核酸酶DNase为天然脱氧核糖核酸酶(DNase I)、重组脱氧核糖核酸酶(DNase I)中的一种或多种。

[0028] 其中,脱氧核糖核酸酶DNase的浓度范围为0.1~10000U/mL,较好的浓度范围为1~1000U/mL,最佳的浓度范围为10~100U/mL。

[0029] 当核酸酶为核糖核酸酶RNase时,核糖核酸酶RNase为核糖核酸酶A (RNaseA)、核糖核酸酶T1 (RNase T1) 中的一种或多种。

[0030] 其中,核糖核酸酶RNase的浓度范围为0.001~50mg/mL,较好的浓度范围为0.01~5mg/mL,最佳的浓度范围为0.05~0.5mg/mL。

[0031] 另外,本发明中:

[0032] 缓冲试剂包括三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES) 中的一种或多种,缓冲试剂的浓度为10~100mmol/L,pH范围为7~8;

[0033] 去垢剂包括聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)、吐温20 (Tween 20)、乙基苯基聚乙二醇 (NP-40) 中的一种或多种,去垢剂的质量分数为0.1%~2%;

[0034] 盐包括氯化钠、氯化钾、醋酸钠中的一种或多种,盐的浓度范围为50~200mmol/L;

[0035] 蛋白酶抑制剂包括亮抑蛋白酶肽 (leupeptin)、天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (pepstatinA) 中的一种或多种,蛋白酶抑制剂的浓度范围为0.001~0.2mmol/L。

[0036] 蛋白抽提溶液的各组分可以在使用前相对较长的时间里部分或全部混合好,也可以在临使用前部分混合或全部混合,或者部分较长时间混合部分临使用前混合。

[0037] 本发明还公开了一种蛋白抽提溶液的应用,蛋白抽提溶液应用于蛋白浓度测定、ELISA检测、免疫印迹检测、蛋白电泳检测、蛋白层析检测、胶体金检测、核磁共振检测、质谱检测中对蛋白样品中蛋白的抽提。

[0038] 蛋白抽提液抽提的蛋白样品可以来源于不同的物种,包括但不限于各种原核生物和真核生物。蛋白样品可以包括但不限于来源于某种生物体的不同器官、组织或特定类型的细胞;样品还包括但不限于各种人工培养的细胞、组织和生物体;蛋白样品可以是存活的细胞、组织和生物体,也可以是非存活的细胞、组织和生物体。

[0039] 以下结合具体实施例和对比例对本发明作进一步说明。

[0040] 对比例1:

[0041] 蛋白抽提溶液A用纯水配置,包括:

[0042] 50mmol/L三羟甲基氨基甲烷 (Tris),pH 7.4;

[0043] 100mmol/L氯化钠 (NaCl);

[0044] 1%聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100);

[0045] 0.1%十二烷基硫酸钠 (SDS);

[0046] 0.1mmol/L亮抑蛋白酶肽 (leupeptin)。

[0047] 实施例1:

[0048] 蛋白抽提溶液A+ (含脱氧核糖核酸酶DNase I) 用纯水配置,包括:

[0049] 50mmol/L三羟甲基氨基甲烷 (Tris),pH 7.4;

[0050] 100mmol/L氯化钠 (NaCl);

[0051] 1%聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100);

[0052] 0.1%十二烷基硫酸钠 (SDS);

[0053] 0.1mmol/L亮抑蛋白酶肽 (leupeptin);

[0054] 200U/ml天然脱氧核糖核酸酶 (DNase I)。

[0055] 对比例2:

[0056] 蛋白抽提溶液B用纯水配置,包括:

- [0057] 20mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), pH 7.8;
- [0058] 100mmol/L 氯化钠 (NaCl);
- [0059] 10mmol/L 氯化钾 (KCl);
- [0060] 1% 乙基苯基聚乙二醇 (NP-40);
- [0061] 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS);
- [0062] 0.002mmol/L 天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (pepstatinA)。
- [0063] 实施例2:
- [0064] 蛋白抽提溶液B+ (含脱氧核糖核酸酶DNase I和核糖核酸酶RNaseA) 用纯水配置, 包括:
- [0065] 20mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES), pH 7.8;
- [0066] 100mmol/L 氯化钠 (NaCl);
- [0067] 10mmol/L 氯化钾 (KCl);
- [0068] 1% 乙基苯基聚乙二醇 (NP-40);
- [0069] 0.2% 十二烷基硫酸钠 (SDS);
- [0070] 0.002mmol/L 天冬氨酸蛋白酶抑制剂 (pepstatinA);
- [0071] 0.2mg/mL 核糖核酸酶 (RNaseA);
- [0072] 50U/mL 重组脱氧核糖核酸酶 (DNase I)。
- [0073] 实施例3:
- [0074] 分别应用配置的蛋白抽提溶液A、A+、B、B+提取小鼠肌肉组织蛋白。
- [0075] 取8周龄C57B/L6小鼠的腓肠肌, 按照每50mg组织加入1ml蛋白抽提溶液的比例, 分别加入蛋白抽提溶液A、A+、B、B+; 使用玻璃匀浆器匀浆, 充分匀浆后, 离心取上清液; 上清液在37℃水浴孵育30分钟。
- [0076] 采用ELISA方法定量检测上清液中的组蛋白H3和CENP-A的含量。
- [0077] 采用适合用于ELISA的96孔酶标板, 加入上述蛋白抽提溶液获得的上清液孵育2小时, PBS洗涤3次后, 加入抗组蛋白H3或抗CENP-A抗体, 孵育1小时; 再用PBS洗涤3次后, 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗, 孵育1小时; 再用PBS洗涤3次后, 加入BeyoECLPlus进行发光检测; 采用Thermo公司的多功能酶标仪检测化学发光检测。
- [0078] 参见图1, 检测结果显示, 加入脱氧核糖核酸酶DNase I, 或加入脱氧核糖核酸酶DNase I和核糖核酸酶RNaseA后, 和未加入核酸酶的相同组分的蛋白抽提液相比, 组蛋白H3和CENP-A的相对发光强度显著升高, 意味着蛋白的含量也显著升高。该结果表明, 在加入核酸酶后可以显著改善蛋白的抽提效果。
- [0079] 在其他实施例中, 脱氧核糖核酸酶DNase的浓度范围可以为0.1~10000U/mL, 较好的浓度范围为1~1000U/mL, 最佳的浓度范围为10~100U/mL; 核糖核酸酶RNase的浓度范围为0.001~50mg/mL, 较好的浓度范围为0.01~5mg/mL, 最佳的浓度范围为0.05~0.5mg/mL。10~100U/mL的脱氧核糖核酸酶DNase及0.001~50mg/mL的核糖核酸酶RNase的蛋白抽提溶液的抽提效果最佳。
- [0080] 由以上技术方案可以看出, 本发明具有如下有益效果:
- [0081] 本发明中的蛋白抽提溶液中通过添加核酸酶, 能够显著改善蛋白的抽提效果, 可适用于较难抽提的蛋白 (如包括核酸结合蛋白), 并且具有成本低的优点;

[0082] 蛋白抽提溶液抽提的蛋白样品可以来源于不同的物种,可以是存活的细胞、组织和生物体,也可以是非存活的细胞、组织和生物体,应用面较为广阔;

[0083] 蛋白抽提溶液可广泛应用于蛋白浓度测定、ELISA检测、免疫印迹检测、蛋白电泳检测、蛋白层析检测、胶体金检测、核磁共振检测、质谱检测等。

[0084] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0085] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

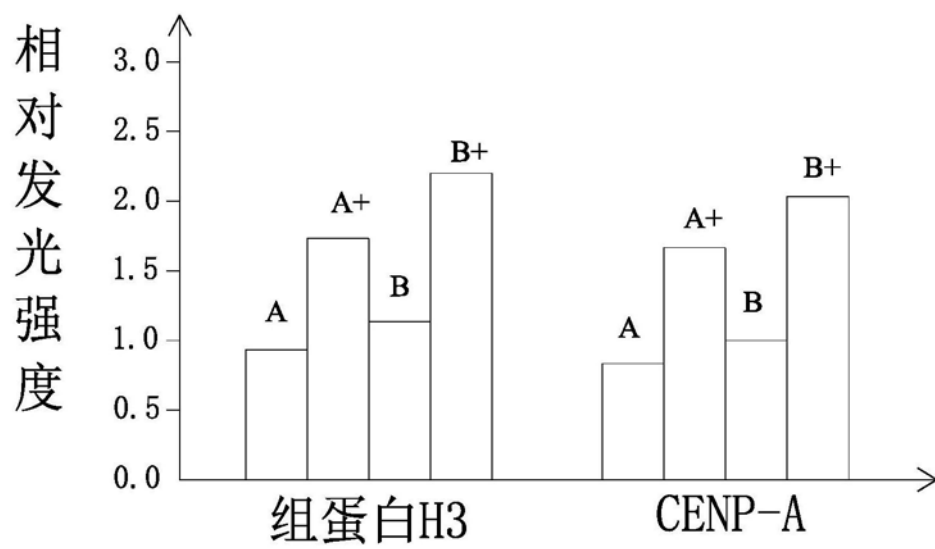


图1