



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110982866 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911420104.7

(22)申请日 2019.12.31

(71)申请人 莫纳(连云港)生物科技有限公司

地址 222000 江苏省连云港市高新区花果
山大道17号科技创业城1号楼13-14层

(72)发明人 葛绍勇 赵盼盼 刘杨 陈志强
夏加权 姜林先

(74)专利代理机构 连云港润知专利代理事务所
32255

代理人 刘喜莲

(51)Int.Cl.

C12P 21/06(2006.01)

C07K 14/78(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

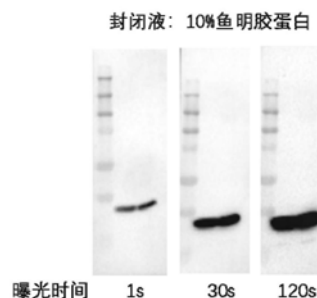
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

用于蛋白质免疫印迹封闭的蛋白粉制备与
封闭方法

(57)摘要

本发明是一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,该方法用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶制成鱼皮明胶溶液,用牛胰蛋白酶和凝血酶冻干粉混合酶溶液酶解,超滤,富集,干燥得到鱼明胶蛋白。本发明还公开了蛋白质免疫印迹封闭方法。本发明有效解决了在蛋白质免疫印迹实验中转印膜的封闭效果不佳、曝光的背景高、非特异性条带检出等常见的问题。采用本发明中用于蛋白质免疫印迹实验的封闭剂,抗体孵育后经ECL底物检测可以得到特异性蛋白检出带且背景干净无杂带,同时也缩短孵育时间至15min,为获得准确、高效的实验结果提供技术基础。



1. 一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法, 其特征在于, 其步骤如下:

- (1) 用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶, 配制成质量浓度为10%-50%的鱼皮明胶溶液;
- (2) 将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉, 按重量比为1:10至10:1的配比, 用灭菌纯化水配制成1mg/mL的混合酶溶液, 备用;
- (3) 将配制好的鱼明胶溶液恒温至37℃, 50-100rpm搅拌;
- (4) 缓慢加入适量配制好的混合酶溶液, 37℃保温反应6h;
- (5) 升温至60℃, 保温30min, 使酶失活, 结束酶解反应;
- (6) 用两级超滤膜系统处理反应液, 一级膜使小分子蛋白透过, 为水解的明胶与适活的酶富集后处理; 蛋白经二级膜浓缩, 富集至蛋白浓度为50%;
- (7) 喷雾干燥, 得到鱼明胶蛋白。

2. 根据权利要求1所述的用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中: 鱼皮明胶溶液的质量浓度为15%-25%。

3. 根据权利要求1所述的用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)中: 将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉, 按重量比为2-5:1的比例配成混合酶溶液。

4. 一种蛋白质免疫印迹封闭方法, 其特征在于, 该方法使用权利要求1或2或3所制得的鱼明胶蛋白粉作封闭液原料, 其具体步骤如下:

(1) 蛋白样本的提取: 取新鲜培养的A549细胞, 去除培养液, 用PBS洗涤细胞; 按照6孔板每孔加入200 μ l RIPA细胞裂解液, 含终浓度为1mM PMSF, 用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触并裂解细胞; 裂解后的细胞样本置于14,000g下离心5min, 取上清液分装到PCR管中, 置于-80℃备用;

(2) 蛋白定量和上样前处理: 取步骤(1)制备的蛋白提取物采用BCA法测定蛋白浓度; 向已测定的蛋白浓度的样本中加入质量体积比5倍的蛋白上样缓冲液, 充分混匀置于95℃金属浴中变性10min, 瞬离置于-80℃备用;

(3) 凝胶制备: 根据蛋白的分子量大小, 配制10%的SDS-PAGE分离胶和5%的SDS-PAGE浓缩胶, 在加入TEMED后立即灌胶;

(4) 灌胶: 将干净的玻璃板固定好, 然后加入预先配制好的分离胶, 并加无水乙醇封除气泡; 待胶凝固后, 用滤纸吸干玻璃板中无水乙醇, 然后加入浓缩胶并插入梳子, 待胶再次凝固后轻轻拔出梳子;

(5) 电泳: 取步骤(4)制备的SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 放置于电泳槽中, 同时向电泳槽中加入TGS电泳缓冲液, 取步骤(2)制备的浓度为2.4mg/mL的A549细胞裂解液上样10 μ L并开始电泳; 浓缩胶电压为80 V, 分离胶电压为130 V, 待条带到达玻璃板底部时结束电泳;

(6) 转膜: 将(5)完成电泳后的分离胶用于转膜; PVDF膜于甲醇中活化3min, 将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中, 从下到上依次放入一层海绵垫, 三层滤纸, 分离胶, PVDF膜, 三层滤纸, 最后盖上一层海绵垫, 排掉气泡, 夹紧夹子, 加入预冷的转膜缓冲液, 设定电流为200 mA, 于冰浴中转膜100 min;

(7) 封闭: 将步骤(6)转好的PVDF膜裁膜处理成4张, 按照以下封闭液和封闭条件进行封闭, 10%鱼明胶蛋白粉封闭液, 室温封闭15min; 5%脱脂乳, 室温封闭1h;

(8) 一抗孵育:取步骤(7)封闭后的膜进行一抗孵育;一抗选择GAPDH特异性抗体,按照说明书推荐进行1:10000稀释,稀释使用一抗稀释液进行稀释,终浓度为0.1 μ g/mL,将封闭后的PVDF膜放入孵育盒中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜后完成后续实验;用TBST洗5次,每次5 min;

(9) 二抗孵育:取步骤(8)孵育一抗后的膜进行二抗孵育;二抗选择HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体,按照说明书推荐进行1:5000稀释,稀释使用对应的封闭缓冲液进行稀释;将膜在二抗中孵育1 h;用TBST洗5次,每次5 min;

(10) 化学发光检测:将步骤(9)完成抗体孵育的膜中加入超敏ECL发光底液,待膜充分接触发光液后,将其放入凝胶成像系统中,设定不同曝光时间:1s、30s、120s,并检测。

5. 根据权利要求4所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于,步骤(1)中,所述的蛋白裂解液各成分终浓度如下:150 mmol/L NaCl,1.0%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1% SDS,50 mmol/L Tris (pH8.0),室温存贮,使用前60 $^{\circ}$ C水浴溶解。

6. 根据权利要求4所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于,所述的PMSF溶液的制备如下:将PMSF溶解于异丙醇中至终浓度达10mM,溶解后分装储存于-20 $^{\circ}$ C中。

7. 根据权利要求4所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于,所述的蛋白上样缓冲液制备如下:50% 甘油,250mM Tris $\cdot$ Cl (pH6.8),10% β -巯基乙醇,1%溴酚蓝,10%的SDS。

8. 根据权利要求4所述的蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于,所述的5%的SDS-PAGE浓缩胶制备如下:配置9ml需要6mlH₂O、1.5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、1.5ml 1M TRIS-HCl (pH 6.8)、120 μ l 10%SDS、90 μ l 10%AP、12 μ l TEMED;

所述的10%SDS-PAGE分离胶制备如下:配置15ml需要5.9mlH₂O、5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、3.8ml 1.5M TRIS-HCl (pH 8.8)、150 μ l 10%SDS、150 μ l 10%AP、7.5 μ l TEMED。

9. 根据权利要求4所述的蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于:所述的TGS电泳缓冲液制备如下:配置1L TGS蛋白电泳缓冲液需要Tris-base 3g, glycine 14.4g, 0.1% SDS (10ml 10% SDS);

所述的转膜缓冲液制备如下:配置1L转膜缓冲液需要 Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml 甲醇;

所述的TBST制备如下:25mM Tris、0.15mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5;所述的5%脱脂乳制备如下:配置100mL 5%脱脂乳需要脱脂乳5g,溶解于TBST缓冲液中;

所述的一抗稀释液制备如下:配置100mL一抗稀释液需要BSA 1g,5%叠氮钠1mL,溶解于TBST缓冲液中。

10. 根据权利要求4所述的蛋白质免疫印迹封闭方法,其特征在于,所述的10%鱼明胶蛋白液制备方法如下:每配置100mL 10%鱼明胶蛋白封闭液需要鱼明胶蛋白粉10g,溶解于TBST缓冲液中。

用于蛋白质免疫印迹封闭的蛋白粉制备与封闭方法

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质研究技术领域,具体涉及一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法;本发明还公开了一种蛋白质免疫印迹封闭方法。

背景技术

[0002] 蛋白质免疫印迹(Western Blot)技术是将蛋白质样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜)上,利用抗原抗体反应来检测目的蛋白的方法。它是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法。

[0003] 常规的Western Blot的操作流程包括:蛋白样品的制备、电泳分离、转膜、封闭、洗涤、一抗孵育、洗涤、二抗孵育、洗涤、检测。然而该方法涉及步骤、因素较多,因此为得到较好的实验结果,常见的影响因素有:蛋白样品的准确定量、蛋白凝胶的制备、转印条件、电泳的条件设置、缓冲液的选择、封闭液的选择和封闭条件、抗体的特异性、化学发光显色液等。

[0004] 对转印膜的充分封闭是获得准确的蛋白测定的关键因素。目前实验室常用的封闭缓冲液有:5%脱脂奶粉、5%BSA等来自于哺乳动物牛源的蛋白成分。而在Western Blot实验中使用的抗体主要来源也是哺乳动物,即便使用特异性抗体,也会增加抗体与封闭液的交叉反应的风险,使得显色后背景过高和非特异性条带的检出,干扰实验的准确性。

[0005] 用BSA作为封闭液,BSA,全称为牛血清蛋白,是牛血清中的一种球蛋白,包含607个氨基酸残基,分子量为66.446KDa,等电点为4.7。BSA是目前WB实验中,封闭效果很好的封闭液,但其价格昂贵,实验成本很高。BSA价格是普通脱脂乳价格的100倍左右;而且BSA来源为哺乳动物,在同源WB实验中,可能带来干扰或污染。

[0006] 用脱脂奶粉作为封闭液,脱脂奶粉是将鲜牛奶脱去脂肪再干燥而成,除脂肪可降低至1%左右外,其他变化不大。脱脂奶粉为乳白色或淡黄色,具温和乳香且带甜味,不可有变质焦味及异臭,粉末状。其蛋白质不低于非脂乳固体的34%,脂肪不高于2.0%的粉末状产品。脱脂奶粉具有价格低的优势。其缺陷在于,脱脂奶粉蛋白含量不高,相比于BSA高达90%的蛋白含量,脱脂奶粉仅有30%以上蛋白含量;而且脱脂奶粉仍然主要来源于哺乳动物,在同源WB实验中,可能带来干扰或污染。所以,研发新的封闭用蛋白粉具有重要的意义。

发明内容

[0007] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,该方法制得的鱼明胶蛋白粉作为封闭液可以提高蛋白质免疫印迹中封闭效果、加速封闭效率、降低实验成本。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种采用前述方法制得的鱼明胶蛋白粉进行蛋白质免疫印迹封闭方法。

[0009] 本发明所要解决的技术问题是通过以下的技术方案来实现的。本发明是一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,其特点是,其步骤如下:

(1) 用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶,配制成质量浓度为10%-50%的鱼皮明胶溶液;

(2) 将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉,按重量比为1:10至10:1的配比,用灭菌纯化水配制成1mg/mL的混合酶溶液,备用;

(3) 将配制好的鱼明胶溶液恒温至37℃,50-100rpm搅拌;

(4) 缓慢加入适量配制好的混合酶溶液,37℃保温反应6h;

(5) 升温至60℃,保温30min,使酶失活,结束酶解反应;

(6) 用两级超滤膜系统处理反应液,一级膜使小分子蛋白透过,为水解的明胶与适活的酶富集后处理;蛋白经二级膜浓缩,富集至蛋白浓度为50%;

(7) 喷雾干燥,得到鱼明胶蛋白。

[0010] 本发明所述的用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,其进一步优选的技术方案是:步骤(1)中:鱼皮明胶溶液的质量浓度为15%-25%。

[0011] 本发明所述的用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,其进一步优选的技术方案是:步骤(2)中:将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉,按重量比为2-5:1的比例配成混合酶溶液。

[0012] 本发明还公开了一种蛋白质免疫印迹封闭方法,该方法使用上述技术方案所制得的鱼明胶蛋白粉作封闭液原料,其具体步骤如下:

(1) 蛋白样本的提取:取新鲜培养的A549细胞,去除培养液,用PBS洗涤细胞;按照6孔板每孔加入200μl RIPA细胞裂解液,含终浓度为1mM PMSF,用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触并裂解细胞;裂解后的细胞样本置于14,000g下离心5min,取上清液分装到PCR管中,置于-80℃备用;

(2) 蛋白定量和上样前处理:取步骤(1)制备的蛋白提取物采用BCA法测定蛋白浓度;向已测定的蛋白浓度的样本中加入质量体积比5倍的蛋白上样缓冲液,充分混匀置于95℃金属浴中变性10min,瞬离置于-80℃备用;

(3) 凝胶制备:根据蛋白的分子量大小,配制10%的SDS-PAGE分离胶和5%的SDS-PAGE浓缩胶,在加入TEMED后立即灌胶;

(4) 灌胶:将干净的玻璃板固定好,然后加入预先配制好的分离胶,并加无水乙醇封除去气泡;待胶凝固后,用滤纸吸干玻璃板中无水乙醇,然后加入浓缩胶并插入梳子,待胶再次凝固后轻轻拔出梳子;

(5) 电泳:取步骤(4)制备的SDS-聚丙烯酰胺凝胶,放置于电泳槽中,同时向电泳槽中加入TGS电泳缓冲液,取步骤(2)制备的浓度为2.4mg/mL的A549细胞裂解液上样10μL并开始电泳;浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为130 V,待条带到达玻璃板底部时结束电泳;

(6) 转膜:将(5)完成电泳后的分离胶用于转膜;PVDF膜于甲醇中活化3min,将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中,从下到上依次放入一层海绵垫,三层滤纸,分离胶,PVDF膜,三层滤纸,最后盖上一层海绵垫,排掉气泡,夹紧夹子,加入预冷的转膜缓冲液,设定电流为200 mA,于冰浴中转膜100 min;

(7) 封闭:将步骤(6)转好的PVDF膜裁膜处理成4张,按照以下封闭液和封闭条件进行封闭,10%鱼明胶蛋白粉封闭液,室温封闭15min;5%脱脂乳,室温封闭1h;

(8) 一抗孵育:取步骤(7)封闭后的膜进行一抗孵育;一抗选择GAPDH特异性抗体,按照说明书推荐进行1:10000稀释,稀释使用一抗稀释液进行稀释,终浓度为0.1μg/mL,将封闭后的PVDF膜放入孵育盒中,4℃孵育过夜后完成后续实验;用TBST洗5次,每次5 min;

(9) 二抗孵育:取步骤(8)孵育一抗后的膜进行二抗孵育;二抗选择HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体,按照说明书推荐进行1:5000稀释,稀释使用对应的封闭缓冲液进行稀释;将膜在二抗中孵育1 h;用TBST洗5次,每次5 min;

(10) 化学发光检测:将步骤(9)完成抗体孵育的膜中加入超敏ECL发光底液,待膜充分接触发光液后,将其放入凝胶成像系统中,设定不同曝光时间:1s、30s、120s,并检测。

[0013] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,步骤(1)中,所述的蛋白裂解液各成分终浓度如下:150 mmol/L NaCl,1.0%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,50 mmol/L Tris(pH8.0),室温存贮,使用前60℃水浴溶解。

[0014] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,所述的PMSF溶液的制备如下:将PMSF溶解于异丙醇中至终浓度达10mM,溶解后分装储存于-20℃中。

[0015] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,所述的蛋白上样缓冲液制备如下:50% 甘油,250mM Tris·Cl (pH6.8),10% β-巯基乙醇,1‰溴酚蓝,10%的SDS。

[0016] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,所述的5%的SDS-PAGE浓缩胶制备如下:配置9ml需要6mlH₂O、1.5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、1.5ml 1M TRIS-HCl (pH 6.8)、120μl 10%SDS、90μl 10%AP、12μl TEMED;

所述的10%SDS-PAGE分离胶制备如下:配置15ml需要5.9mlH₂O、5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、3.8ml 1.5M TRIS-HCl (pH 8.8)、150μl 10%SDS、150μl 10%AP、7.5μl TEMED。

[0017] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,所述的TGS电泳缓冲液制备如下:配置1L TGS蛋白电泳缓冲液需要Tris-base 3g, glycine 14.4g, 0.1% SDS(10ml 10% SDS);

所述的转膜缓冲液制备如下:配置1L转膜缓冲液需要 Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml 甲醇;

所述的TBST制备如下:25mM Tris、0.15mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5;所述的5%脱脂乳制备如下:配置100mL 5%脱脂乳需要脱脂乳5g,溶解于TBST缓冲液中;

所述的一抗稀释液制备如下:配置100mL一抗稀释液需要BSA 1g, 5%叠氮钠1mL,溶解于TBST缓冲液中。

[0018] 本发明所述的一种蛋白质免疫印迹封闭方法,其进一步优选的技术方案是,所述的10%鱼明胶蛋白液制备方法如下:每配置100mL 10%鱼明胶蛋白封闭液需要鱼明胶蛋白粉10g,溶解于TBST缓冲液中。鱼明胶蛋白液也可以采用现有技术中常用的蛋白溶剂进行溶解。

[0019] 与现有技术相比,本发明方法具有以下有益效果:

(1) 本发明方法从鱼皮中提取的胶蛋白,进行混合/分段水解生成大小不一的蛋白,所制得的蛋白较传统的大分子脱脂乳混合蛋白,其对转印膜的封闭更为充分,曝光背景干净。

[0020] (2) 本发明方法制得的鱼明胶蛋白封闭效率高,经实验验证,可以达到15分钟室温快速封闭。

[0021] (3) 本发明方法制得的鱼明胶蛋白特异性强;它区别于与抗体来源相同的哺乳动物源脱脂乳,不会与孵育抗体发生非特异性反应,增强实验结果的准确性。

[0022] (4)本发明方法制得的鱼明胶蛋白成本低,它和价格较高的脱脂奶粉相比,鱼明胶蛋白的获得可从废弃的鱼鳞中提取,制备方法简单成本低。

[0023] (5)本发明制备方法制得的鱼明胶蛋白作为一种应用于Western Blot实验中的新型封闭液,通过对其进行混合/分段水解,使其产生分子量大小不均一的蛋白,使其封闭效果优于传统的分子量大小固定的蛋白。鱼明胶蛋白的提取来源区别于哺乳动物,不会与抗体发生交叉反应,避免了背景反应,增强了实验结果的特异性。

附图说明

[0024] 图1是用10%鱼明胶蛋白室温封闭15min转印膜后经抗体孵育的不同曝光时间的检测结果图;

图2是使用5%脱脂乳室温封闭1h转印膜后经抗体孵育的不同曝光时间的检测结果图;

图3是商品化快速封闭试剂A室温封闭15min转印膜后经抗体孵育的不同曝光时间的检测结果图;

图4是商品化快速封闭试剂B室温封闭15min转印膜后经抗体孵育的不同曝光时间的检测结果图。

具体实施方式

[0025] 以下进一步描述本发明的具体技术方案,以便于本领域的技术人员进一步地理解本发明,而不构成对其权利的限制。

[0026] 实施例1,一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,其步骤如下:

- (1)用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶,配制成质量浓度为15%的鱼皮明胶溶液;
- (2)将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉,按重量比为3:1的配比,用灭菌纯化水配制成1mg/mL的混合酶溶液,备用;
- (3)将配制好的鱼明胶溶液恒温至37℃,80rpm搅拌;
- (4)缓慢加入适量配制好的混合酶溶液,37℃保温反应6h;
- (5)升温至60℃,保温30min,使酶失活,结束酶解反应;
- (6)用两级超滤膜系统处理反应液,一级膜使小分子蛋白透过,为水解的明胶与适活的酶富集后处理;蛋白经二级膜浓缩,富集至蛋白浓度为50%;
- (7)喷雾干燥,得到鱼明胶蛋白。

[0027] 实施例2,一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法,其步骤如下:

- (1)用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶,配制成质量浓度为25%的鱼皮明胶溶液;
- (2)将牛胰蛋白酶、凝血酶冻干粉,按重量比为2:1的配比,用灭菌纯化水配制成1mg/mL的混合酶溶液,备用;
- (3)将配制好的鱼明胶溶液恒温至37℃,100rpm搅拌;
- (4)缓慢加入适量配制好的混合酶溶液,37℃保温反应6h;
- (5)升温至60℃,保温30min,使酶失活,结束酶解反应;
- (6)用两级超滤膜系统处理反应液,一级膜使小分子蛋白透过,为水解的明胶与适活的

酶富集后处理;蛋白经二级膜浓缩,富集至蛋白浓度为50%;

(7)喷雾干燥,得到鱼明胶蛋白。

[0028] 实施例3,一种蛋白质免疫印迹封闭方法,该方法使用实施例1或2所制得的鱼明胶蛋白粉作封闭液原料,其具体步骤如下:

(1)蛋白样本的提取:取新鲜培养的A549细胞,去除培养液,用PBS洗涤细胞;按照6孔板每孔加入200 μ l RIPA细胞裂解液,含终浓度为1mM PMSF,用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触并裂解细胞;裂解后的细胞样本置于14,000g下离心5min,取上清液分装到PCR管中,置于-80℃备用;

(2)蛋白定量和上样前处理:取步骤(1)制备的蛋白提取物采用BCA法测定蛋白浓度;向已测定的蛋白浓度的样本中加入质量体积比5倍的蛋白上样缓冲液,充分混匀置于95℃金属浴中变性10min,瞬离置于-80℃备用;

(3)凝胶制备:根据蛋白的分子量大小,配制10%的SDS-PAGE分离胶和5%的SDS-PAGE浓缩胶,在加入TEMED后立即灌胶;

(4)灌胶:将干净的玻璃板固定好,然后加入预先配制好的分离胶,并加无水乙醇封除去气泡;待胶凝固后,用滤纸吸干玻璃板中无水乙醇,然后加入浓缩胶并插入梳子,待胶再次凝固后轻轻拔出梳子;

(5)电泳:取步骤(4)制备的SDS-聚丙烯酰胺凝胶,放置于电泳槽中,同时向电泳槽中加入TGS电泳缓冲液,取步骤(2)制备的浓度为2.4mg/mL的A549细胞裂解液上样10 μ L并开始电泳;浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为130 V,待条带到达玻璃板底部时结束电泳;

(6)转膜:将(5)完成电泳后的分离胶用于转膜;PVDF膜于甲醇中活化3min,将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中,从下到上依次放入一层海绵垫,三层滤纸,分离胶,PVDF膜,三层滤纸,最后盖上一层海绵垫,排掉气泡,夹紧夹子,加入预冷的转膜缓冲液,设定电流为200 mA,于冰浴中转膜100 min;

(7)封闭:将步骤(6)转好的PVDF膜裁膜处理成4张,按照以下封闭液和封闭条件进行封闭,10%鱼明胶蛋白粉封闭液,室温封闭15min;5%脱脂乳,室温封闭1h;

(8)一抗孵育:取步骤(7)封闭后的膜进行一抗孵育;一抗选择GAPDH特异性抗体,按照说明书推荐进行1:10000稀释,稀释使用一抗稀释液进行稀释,终浓度为0.1 μ g/mL,将封闭后的PVDF膜放入孵育盒中,4℃孵育过夜后完成后续实验;用TBST洗5次,每次5 min;

(9)二抗孵育:取步骤(8)孵育一抗后的膜进行二抗孵育;二抗选择HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体,按照说明书推荐进行1:5000稀释,稀释使用对应的封闭缓冲液进行稀释;将膜在二抗中孵育1 h;用TBST洗5次,每次5 min;

(10)化学发光检测:将步骤(9)完成抗体孵育的膜中加入超敏ECL发光底液,待膜充分接触发光液后,将其放入凝胶成像系统中,设定不同曝光时间:1s、30s、120s,并检测。

[0029] 所述的蛋白裂解液各成分终浓度如下:150 mmol/L NaCl,1.0%NP-40,0.5%脱氧胆酸钠,0.1%SDS,50 mmol/L Tris (pH8.0),室温存贮,使用前60℃水浴溶解。

[0030] 所述的PMSF溶液的制备如下:将PMSF溶解于异丙醇中至终浓度达10mM,溶解后分装储存于-20℃中。

[0031] 所述的蛋白上样缓冲液制备如下:50% 甘油,250mM Tris • Cl (pH6.8),10% β -巯基乙醇,1‰溴酚蓝,10%的SDS。

[0032] 所述的5%的SDS-PAGE浓缩胶制备如下:配置9ml需要6mlH₂O、1.5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、1.5ml 1M TRIS-HCl (pH 6.8)、120 μ l 10%SDS、90 μ l 10%AP、12 μ l TEMED;

所述的10%SDS-PAGE分离胶制备如下:配置15ml需要5.9mlH₂O、5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、3.8ml 1.5M TRIS-HCl (pH 8.8)、150 μ l 10%SDS、150 μ l 10%AP、7.5 μ l TEMED。

[0033] 所述的TGS电泳缓冲液制备如下:配置1L TGS蛋白电泳缓冲液需要Tris-base 3g, glycine 14.4g, 0.1% SDS(10ml 10% SDS);

所述的转膜缓冲液制备如下:配置1L转膜缓冲液需要 Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml 甲醇;

所述的TBST制备如下:25mM Tris、0.15mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5;所述的5%脱脂乳制备如下:配置100mL 5%脱脂乳需要脱脂乳5g,溶解于TBST缓冲液中;

所述的一抗稀释液制备如下:配置100mL一抗稀释液需要BSA 1g, 5%叠氮钠1mL,溶解于TBST缓冲液中。

[0034] 所述的10%鱼明胶蛋白液制备方法如下:每配置100mL 10%鱼明胶蛋白封闭液需要鱼明胶蛋白粉10g,溶解于TBST缓冲液中。

[0035] 实施例4,蛋白质免疫印迹封闭方法对比实验:

1、试剂准备

(1)制备蛋白裂解液 蛋白裂解液各成分终浓度如下:150 mmol/L NaCl, 1.0%NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1%SDS, 50 mmol/L Tris(pH8.0), 室温存贮, 使用前60℃水浴溶解。

[0036] (2)制备PMSF溶液 将PMSF溶解于异丙醇中至终浓度达10mM,溶解后分装储存于-20℃中。

[0037] (3)制备蛋白上样缓冲液, 5 X蛋白上样缓冲液各组分如下:50% 甘油, 250mM Tris • Cl (pH6.8), 10% β -巯基乙醇, 1%溴酚蓝, 10%的SDS。(4)制备SDS-聚丙烯酰胺凝胶分为浓缩胶和分离胶2种:制备5%的SDS-PAGE浓缩胶-配置9ml需要6mlH₂O、1.5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、1.5ml 1M TRIS-HCl (pH 6.8)、120 μ l 10%SDS、90 μ l 10%AP、12 μ l TEMED;制备10%的SDS-PAGE分离胶-配置15ml需要5.9mlH₂O、5ml 30%丙烯酰胺(29:1)、3.8ml 1.5M TRIS-HCl (pH 8.8)、150 μ l 10%SDS、150 μ l 10%AP、7.5 μ l TEMED。

[0038] (5)制备TGS电泳缓冲液 配置1L TGS蛋白电泳缓冲液需要Tris-base 3g, glycine 14.4g, 0.1% SDS(10ml 10% SDS)。

[0039] (6)制备湿转所需的转膜缓冲液 配置1L湿转用转膜缓冲液需要 Tris-base 3g, glycine 14.4g, 200ml 甲醇。

[0040] (7)制备TBST洗涤缓冲液 各组分终浓度:25mM Tris、0.15mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5。

[0041] (8)制备5%脱脂乳 配置100mL 5%脱脂乳需要脱脂乳5g,溶解于TBST缓冲液中。

[0042] (9)制备10%鱼明胶蛋白 配置100mL 10%鱼明胶蛋白封闭液需要水解处理的鱼明胶蛋白10g,溶解于TBST缓冲液中。

[0043] (10)制备一抗稀释液 配置100mL一抗稀释液需要BSA 1g, 5%叠氮钠1mL,溶解于TBST缓冲液中。

[0044] 2、不同封闭液在Western Blot实验中封闭效果的比较,包括如下步骤:

(1)蛋白样本的提取:取新鲜培养的A549细胞,去除培养液,用PBS洗涤细胞。按照6孔板

每孔加入200 μ l RIPA细胞裂解液(含终浓度为1mM PMSF),用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触并裂解细胞。裂解后的细胞样本置于14,000g下离心5min,取上清液分装到PCR管中,置于-80℃备用;

(2)蛋白定量和上样前处理:取(1)制备的蛋白提取物采用BCA法测定蛋白浓度。向已测定的蛋白浓度的样本中加入质量体积比5倍的蛋白上样缓冲液,充分混匀置于95℃金属浴中变性10min,瞬离置于-80℃备用;

(3)凝胶制备:根据蛋白的分子量大小,配制10%的SDS-PAGE分离胶和5%的SDS-PAGE浓缩胶,为防止胶凝固应在加入TEMED后立即灌胶;

(4)灌胶:将干净的玻璃板固定好,然后加入预先配制好的分离胶,并加无水乙醇封除去气泡。待胶凝固后,用滤纸吸干玻璃板中无水乙醇,然后加入浓缩胶并插入梳子,待胶再次凝固后轻轻拔出梳子;

(5)电泳:取(4)制备的SDS-聚丙烯酰胺凝胶,放置于电泳槽中,同时向电泳槽中加入TGS电泳缓冲液,取(2)制备的浓度为2.4mg/mL的A549细胞裂解液上样10 μ L并开始电泳。浓缩胶电压为80 V,分离胶电压为130 V,待条带到达玻璃板底部时结束电泳;

(6)转膜:将(5)完成电泳后的分离胶用于转膜。PVDF膜于甲醇中活化3min,将夹子的黑色面放入装有转移液的玻璃平皿中,从下到上依次放入一层海绵垫,三层滤纸,分离胶, PVDF膜,三层滤纸,最后盖上一层海绵垫,排掉气泡,夹紧夹子,加入预冷的转膜缓冲液,设定电流为200 mA,于冰浴中转膜100 min;

(7)封闭:将(6)转好的PVDF膜裁膜处理成4张,分别按照以下封闭液和封闭条件进行封闭,10%鱼明胶蛋白封闭液、商品化快速封闭试剂A、B,室温封闭15min;5%脱脂乳,室温封闭1h;

(8)一抗孵育:取(7)封闭后的膜进行一抗孵育。一抗选择武汉三鹰鼠源的GAPDH特异性抗体,按照说明书推荐进行1:10000稀释,稀释使用一抗稀释液进行稀释,终浓度为0.1 μ g/mL,将封闭后的PVDF膜放入孵育盒中,4℃孵育过夜后完成后续实验。用TBST洗5次,每次5 min;

(9)二抗孵育:取(8)孵育一抗后的膜进行二抗孵育。二抗选择武汉三鹰HRP标记的山羊抗鼠IgG抗体,按照说明书推荐进行1:5000稀释,稀释使用对应的封闭缓冲液进行稀释。将膜在二抗中孵育1 h。用TBST洗5次,每次5 min;

(10)化学发光检测:将(9)完成抗体孵育的膜中加入超敏ECL发光底液,待膜充分接触发光液后,将其放入凝胶成像系统中,设定不同曝光时间:1s、30s、120s,并检测。

[0045] 结果参见图1—4。结果表明,本发明方法有效解决了在蛋白质免疫印迹实验中转印膜的封闭效果不佳、曝光的背景高、非特异性条带检出等常见的问题。采用本发明中用于蛋白质免疫印迹实验的封闭剂,抗体孵育后经ECL底物检测可以得到特异性蛋白检出带且背景干净无杂带,同时也缩短孵育时间至15min,为获得准确、高效的实验结果提供技术基础。

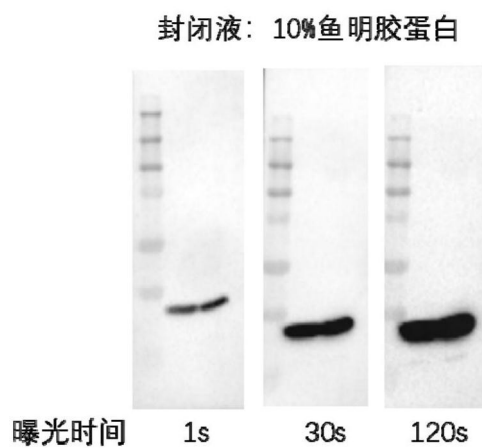


图1

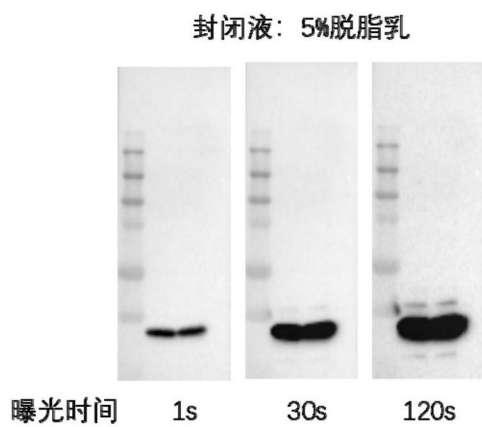


图2

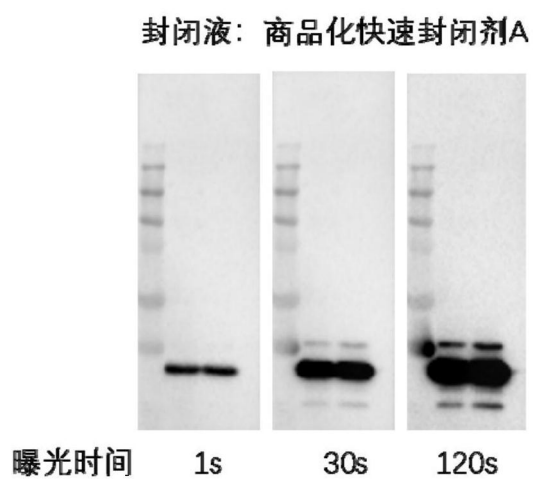


图3

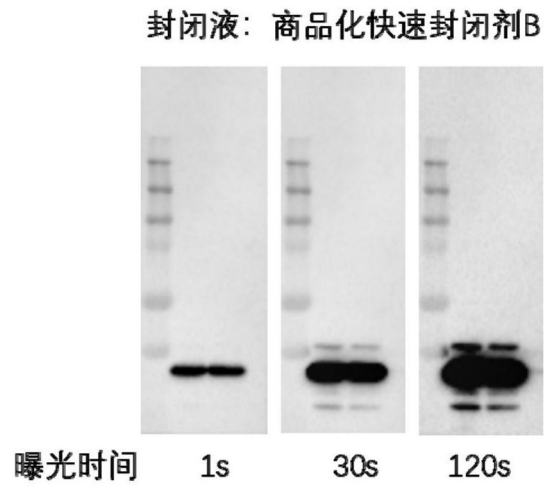


图4

专利名称(译)	用于蛋白质免疫印迹封闭的蛋白粉制备与封闭方法		
公开(公告)号	CN110982866A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911420104.7	申请日	2019-12-31
[标]发明人	葛绍勇 赵盼盼 刘杨 陈志强		
发明人	葛绍勇 赵盼盼 刘杨 陈志强 夏加权 姜林先		
IPC分类号	C12P21/06 C07K14/78 C07K1/34 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/78 C12P21/06 G01N33/5306		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是一种用于蛋白质免疫印迹中封闭转印膜的鱼明胶蛋白粉的制备方法，该方法用PBS缓冲液溶解海鱼鱼皮明胶制成鱼皮明胶溶液，用牛胰蛋白酶和凝血酶冻干粉混合酶溶液酶解，超滤，富集，干燥得到鱼明胶蛋白。本发明还公开了蛋白质免疫印迹封闭方法。本发明有效解决了在蛋白质免疫印迹实验中转印膜的封闭效果不佳、曝光的背景高、非特异性条带检出等常见的问题。采用本发明中用于蛋白质免疫印迹实验的封闭剂，抗体孵育后经ECL底物检测可以得到特异性蛋白检出带且背景干净无杂带，同时也缩短孵育时间至15min，为获得准确、高效的实验结果提供技术基础。

封闭液：10%鱼明胶蛋白

