



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110514821 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201910429201.6

(22)申请日 2019.05.22

(71)申请人 武汉三鹰生物技术有限公司

地址 430070 湖北省武汉市东湖新技术开发区
高新大道666号D3-3栋

(72)发明人 张密 吴宇宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法

(57)摘要

本发明提供了一种可以快速高效地去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗，蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法。并且在不需要重新进行电泳、转膜，不破坏膜上的转印的蛋白质的情况下，使蛋白免疫印迹膜可以重复使用。

1. 一种蛋白质免疫印迹膜重生液,由A液和B液两组分构成,其特征在于:

所述A液包括如下含量的组分:

1% 考马斯亮蓝,

35%-45% 甲醇溶液,

10% 乙酸溶液,

44%-54% 的双蒸水溶液;

所述B液包括如下含量的组分:

95%-100% 甲醇溶液,

0%-5% 蒸水溶液。

2. 根据权利要求1所述的重生液A液,其特征在于:将考马斯亮蓝粉末、甲醇溶液、乙酸溶液和双蒸水按比例混合,搅拌至粉末完全融化,常温保存。

3. 根据权利要求1所述的重生液B液,其特征在于:将甲醇溶液和双蒸水溶液按比例混合,搅拌均匀,常温保存。

4. 根据权利要求1,2,3所述的重生液,其特征在于:其应用分为两步,第一步,用A液浸染蛋白质免疫印迹膜5min-30min,完成显色反应后晾干;第二步,用B液洗涤蛋白质免疫印迹膜,将一抗二抗结合物从蛋白质免疫印迹膜上洗脱掉。

5. 据权利要求4所述的重生液,其特征在于:它可以去除以聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)为蛋白质固相载体的蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗。

6. 根据权利要求4所述的重生液,其特征在于:它去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗适用但不限于蛋白质免疫印迹结果检测方法中的化学发光法。

一种蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抗体检测领域,具体地说,涉及蛋白质免疫印迹技术。特别是蛋白质免疫印迹膜的重复利用。

背景技术

[0002] 蛋白质免疫印迹方法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技术,广泛应用于蛋白质表达水平的检测和鉴定。其步骤包括:(1)蛋白质凝胶电泳;(2)电印迹的方法将凝胶中的蛋白质转移到固相载体,如PVDF膜上;(3)一抗与固相载体上带有特定抗原决定簇的抗原进行特异性结合;(4)HRP酶标记过的二级抗体与一抗结合;(5)二级抗体标记物发生化学发光反应检测待测抗体的分子量与表达量是否与预期相符。

[0003] 一般情况下,结合了蛋白质或抗原的固相载体只能进行一次蛋白质免疫印迹实验。在免疫学理论基础上,抗原抗体的结合是分子表面的非共价键结合,形成的复合物是不牢固的,在一定条件下(如低PH、高浓度盐等)可以解离。本发明人在不影响显影信号强弱的原则下,发明了这种可以快速高效地去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗,并且在不需要重新进行电泳、转膜,不破坏膜上的转印的蛋白质的情况下,使蛋白免疫印迹膜可以重复使用的蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法。

发明内容

[0004] 本发明是一种高效实用的蛋白质免疫印迹膜重生液。

[0005] 本发明所提供的蛋白质免疫印迹膜重生液,由A液和B液两组分构成。

[0006] 所述A液包括的组分的含量为:

1% 考马斯亮蓝,

35%-45% 甲醇溶液,

10% 乙酸溶液,

44%-54% 的双蒸水溶液;

所述B液包括的组分的含量为:

95%-100% 甲醇溶液,

0%-5% 双蒸水溶液。

[0007] 本发明所述的蛋白质免疫印迹膜重生液可按下述工艺过程进行,包括如下步骤:

所述A液的配制:(1)量取400 ml双蒸水溶液,加入100 ml乙酸溶液和350 ml-450 ml 的甲醇溶液;(2)称取10g考马斯亮蓝粉末,加入步骤(1)的溶液中使其溶解,充分混匀;(3)用双蒸水将步骤(2)得到的液体定容至1L,充分混匀得蛋白质免疫印迹膜重生液A液,常温保存。

[0008] 所述B液的配制:(1)量取0 ml-50 ml双蒸水溶液;(2)用100%的甲醇溶液将步骤(1)液体定容至1L,充分混匀得蛋白质免疫印迹膜重生液B液,常温保存。

[0009] 本发明所提到的重生液A液为抗原抗体复合物提供了一种适合的解离环境,A液中过量的考马斯与环境中所有蛋白质通过离子键或疏水作用结合,将一抗二抗替换下来,达

到抗原抗体复合物充分解离的目的。解离后的抗原或抗体分子,仍保持原来的理化特性及生物学性状。

[0010] 本发明所提到的重生液B液的作用是将A液从免疫印迹膜上洗脱下来。

[0011] 本发明提供的蛋白质免疫印迹膜重生液主要有以下几点优势。

[0012] 1、可以使一张转印了多组织细胞裂解液样本的蛋白质免疫印迹膜重复使用多次。

[0013] 2、对于实验的稳定性而言,本发明可以减少实验步骤,不需要上样、跑胶及转膜等实验步骤,用同一张蛋白质免疫印迹膜用多种组织对不同抗体的进行检测,给实验带来方便。

[0014] 3、可以适用于去除以聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)为蛋白质固相载体的蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗。

[0015] 4、可以使固相载体上的蛋白质产生显色反应,能将原本不可见的蛋白质条带染成肉眼可见的蓝色,最后再用B液将其洗脱掉。

[0016] 5、对于生产成本而言,本发明大大的节约了实验耗材和人力资源,

6、本发明所提及的重生液去除结合在蛋白质免疫印迹膜上的一抗二抗结合物需要10 min-60 min。蛋白质免疫印迹膜与A液B液的反应时间以5 min-30 min为最佳。

[0017] 以下,将结合具体实施方式,对本发明的技术方案及优点做出更加详细的解释和说明。应当理解的是,说明书、具体实施方式及说明书附图中所呈现的内容,仅仅为了更加清楚地说明本发明的技术方案及其优点,并不对本发明的保护范围构成限制。本领域技术人员能够在说明书公开内容的基础上,针对各种合理的变换得到变化后的技术方案,只要不脱离本发明的精神,各种变化后的技术方案均包括在本发明的保护范围之内。

附图说明

[0018] 图1为转印了多组织裂解液的PVDF膜结合Mouse anti-Tubulin-beta抗体的第一次显影结果;

图2为转印了多组织裂解液的PVDF膜第一次重生后结合Mouse anti-IDE抗体的显影结果;

图3为转印了多组织裂解液的PVDF膜第二次重生后结合Mouse anti-Cyclin H抗体的显影结果;

图4为转印了多组织裂解液的PVDF膜第三次重生后结合Mouse anti-FLII抗体的显影结果

具体实施方式

[0019] 试剂配制中使用的考马斯亮蓝购自美国Sigma-Aldrich公司。

[0020] 试剂配制中使用的乙酸溶液、甲醇溶液购自中国医药集团。

[0021] 实验步骤中使用的固相载体-PVDF膜购自美国Millipore公司。

[0022] 实验步骤中使用的一抗分别为:

(1)Mouse anti-Tubulin-beta,鼠抗Tubulin-beta蛋白的单抗,货号:66240-1-Ig,识别目标蛋白的分子量:50kDa,来自美国Proteintech公司。

[0023] (2)Mouse anti-IDE,鼠抗IDE蛋白的单抗,货号:67106-1-Ig,识别目标蛋白的分

子量:100-120kDa,来自美国Proteintech公司。

[0024] (3) Mouse anti-Cyclin H鼠抗Cyclin H蛋白的单抗货号:67065-1-Ig,识别目标蛋白的分子量:36kDa,来自美国Proteintech公司。

[0025] (4) Mouse anti-FLII 鼠抗FLII蛋白的单抗货号:67039-1-Ig,识别目标蛋白的分子量:140-150kDa,来自美国Proteintech公司。

[0026] 实验步骤中使用的二抗:HRP-Goat anti-Mouse辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠的二抗购自美国Jackson ImmunoResearch 公司

实验步骤中使用的ECL显色底物来自美国Proteintech公司。

[0027] 其他实验原料及试剂均为实验室常规原料及试剂。

[0028] 1、实验试剂配制

本实验所使用的蛋白质免疫印迹膜重生液,由A液和B液两组分构成。所述A液包括的组分的含量为:

1% 考马斯亮蓝,

40% 甲醇溶液,

10% 乙酸溶液,

49% 双蒸水溶液;

所述B液包括的组分的含量为:

100% 甲醇溶液,

本实验所使用的蛋白质免疫印迹膜重生液可按下述工艺过程进行,包括如下步骤:所述A液的配制:(1)量取400 ml双蒸水溶液,加入100 ml乙酸溶液和400ml 的甲醇溶液;(2)称取10g考马斯亮蓝粉末,加入步骤(1)的溶液中使其溶解,充分混匀;(3)用双蒸水将步骤(2)得到的液体定容至1L,充分混匀得蛋白质免疫印迹膜重生液A液,常温保存。

[0029] 所述B液的配制:量取 1L 100%的甲醇即为蛋白质免疫印迹膜重生液B液,常温保存。

[0030] 所述洗涤液:体积比为0.05%Tween 20的10mM 磷酸盐缓冲液

所述封闭液:质量比为5%脱脂牛奶的洗涤液。

[0031] 2、实验方法

(1) 分别使用Hela,HEK-293,HepG2,Jurkat,HSC-T6,MCF-7,NCCIT,HT-1080,LNCAP 九个细胞系裂解液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白上样量为50 μ g/孔;

(2) 将凝胶中的蛋白用电印迹的方法转移到PVDF膜上,用封闭液进行封闭;

(3) 加入1:200000封闭液稀释的待测一抗(Mouse anti-Tubulin-beta),室温孵育1.5小时;

(4) 洗涤液洗涤一抗三次,每次10分钟;

(5) 加入1:10000封闭液稀释的酶标二抗(HRP-Goat anti-Mouse),室温孵育1.5小时;

(6) 洗涤液洗涤酶标二抗五次(HRP-Goat anti-Mouse),每次10分钟;

(7) 用ECL底物发光法进行显影,显影结果见图一,图一:转印了多组织裂解液的PVDF膜第一次显影,其结果显示测得的Mouse anti-Tubulin-beta分子量为50kDa,与理论分子量的大小相符。

[0032] (8) 将A液与步骤(7)中用过的蛋白质免疫印迹膜混合,置于摇床上,室温孵育

5min-30min分钟,晾干待用;

(9) 将B液与步骤(8)中用过的蛋白质免疫印迹膜混合,洗脱至蛋白质免疫印迹膜上无蓝色条带;

(10) 洗涤液洗涤B液三次,每次1分钟;

(11) 将蛋白质免疫印迹膜用封闭液进行室温封闭1小时,洗涤液洗涤3次;

(12) 加入用封闭液1:10000稀释的一抗(Mouse anti-IDE),室温孵育1.5小时;

(13) 实验方法同步骤(4)(5)(6)(7),显影结果见图二,图二说明:第一次重生后的PVDF膜显影结果,显示测得的Mouse anti-IDE分子量为110kDa,在理论分子量大小范围内。显影结果显示50kDa附近没有条带,证明第一次孵育的一抗Mouse anti-Tubulin-beta被完全洗脱掉。

[0033] (14) 实验方法同步骤(8)(9)(10)(11);

(15) 加入用封闭液按1:10000稀释的一抗(Mouse anti-Cyclin H),室温孵育1.5小时;

(16) 实验方法同步骤(4)(5)(6)(7),显影结果见图三,图三说明:第二次重生后PVDF膜显影结果。结果显示测得的Mouse anti-Cyclin H分子量为36kDa,与理论分子量的大小相符。显影结果显示50kd和110kDa附近都没有条带,证明第一次孵育的一抗Mouse anti-Tubulin-beta和第二次孵育的一抗Mouse anti-IDE与膜上蛋白结合的抗体均被完全洗脱掉。

[0034] (17) 实验方法同步骤(8)(9)(10)(11);

(18) 加入用封闭液1:10000稀释的一抗(Mouse anti-FLII),室温孵育1.5小时;

(19) 实验方法同步骤(4)(5)(6)(7),显影结果见图四,图四说明:第三次重生后PVDF膜显影结果。结果显示测得的Mouse anti-FLII分子量为150kDa,与理论分子量的大小相符。显影结果显示50kd、110kd、36kDa附近均没有条带,证明前三次与膜上蛋白结合的抗体均被完全洗脱掉。

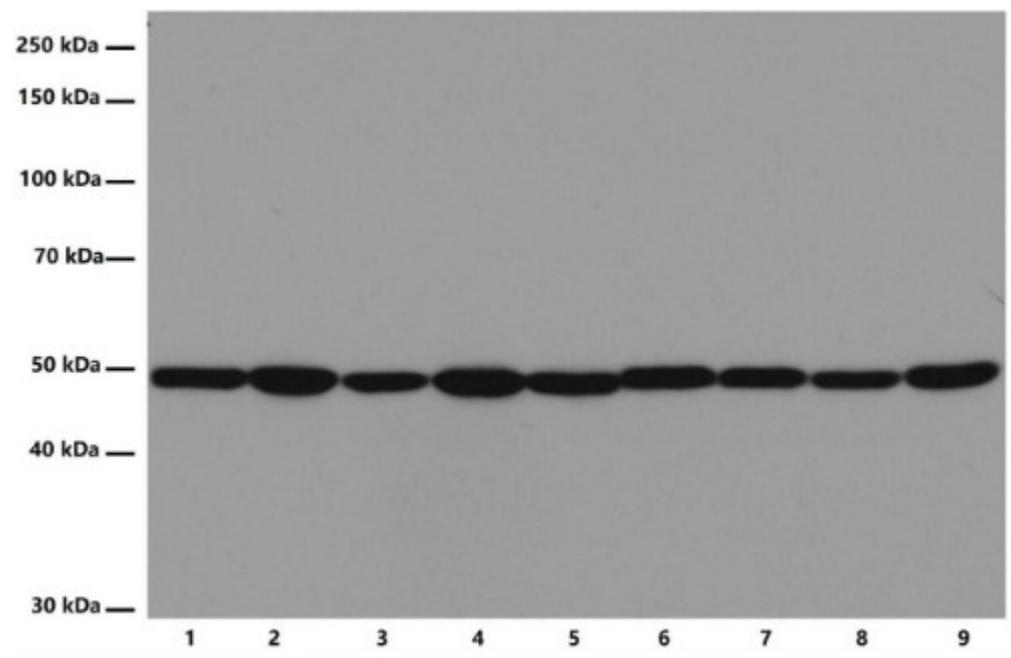


图1

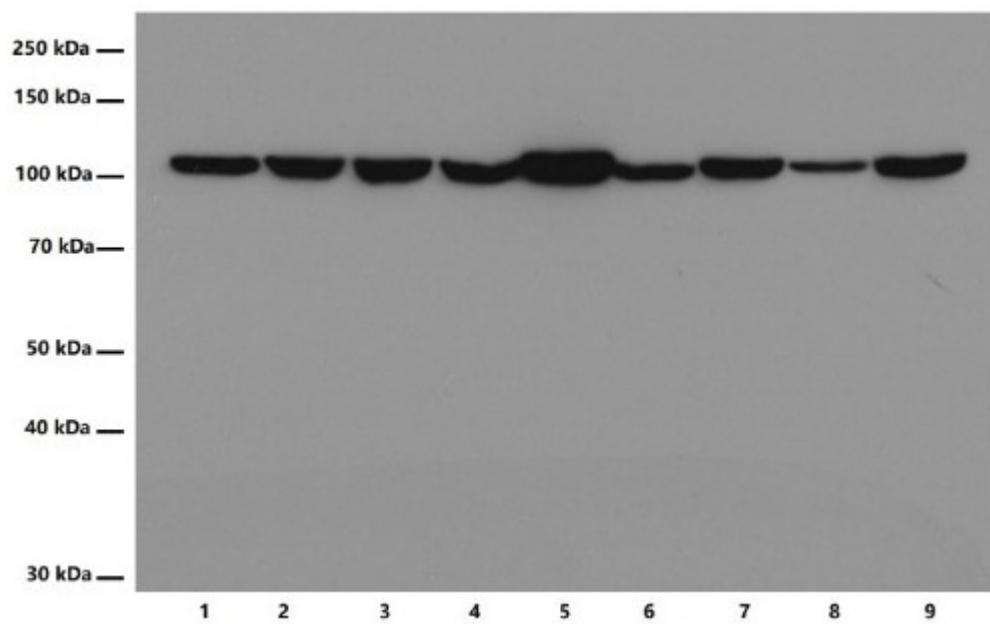


图2

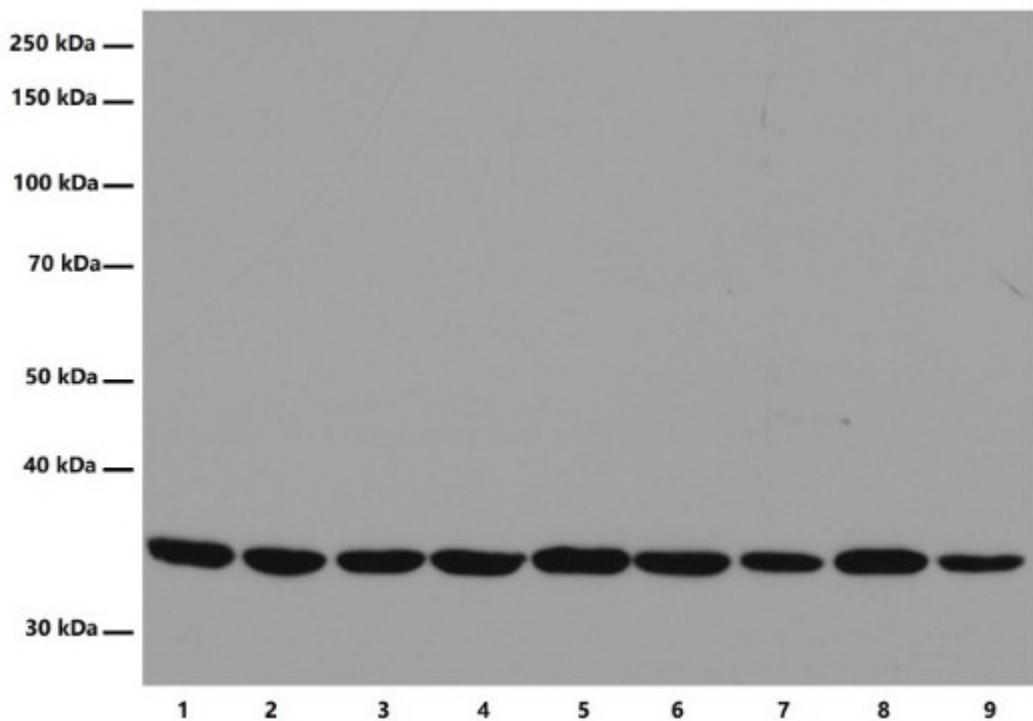


图3

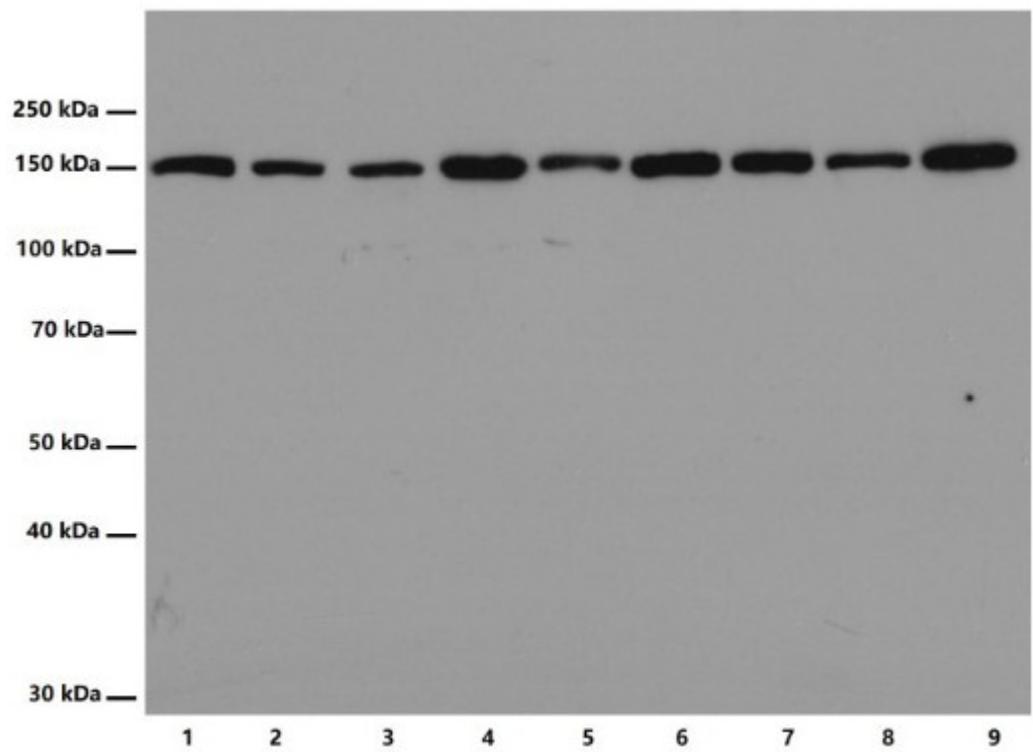


图4

专利名称(译)	一种蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法		
公开(公告)号	CN110514821A	公开(公告)日	2019-11-29
申请号	CN201910429201.6	申请日	2019-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉三鹰生物技术有限公司		
[标]发明人	吴宇宁		
发明人	张密 吴宇宁		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明提供了一种可以快速高效地去除蛋白质免疫印迹膜上结合的一抗和二抗，蛋白质免疫印迹膜重生液及其使用方法。并且在不需要重新进行电泳、转膜，不破坏膜上的转印的蛋白质的情况下，使蛋白免疫印迹膜可以重复使用。

