



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106800596 A

(43)申请公布日 2017.06.06

(21)申请号 201611161183.0

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2016.12.15

(71)申请人 大连海洋大学

地址 116000 辽宁省大连市沙河口区黑石礁街52号

(72)发明人 赵欢 周一兵 李娜 杨大佐
赵子涵

(74)专利代理机构 大连非凡专利事务所 21220
代理人 闪红霞

(51)Int.Cl.

C07K 14/435(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

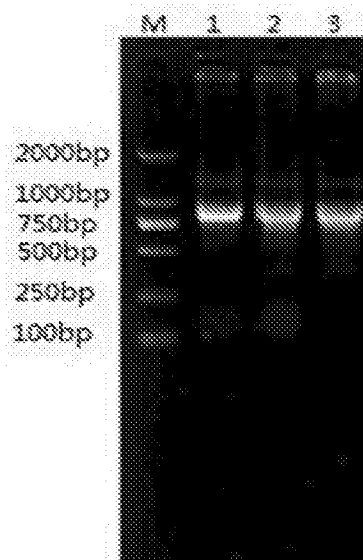
权利要求书2页 说明书6页
序列表1页 附图5页

(54)发明名称

双齿围沙蚕G α 重组蛋白、多克隆抗体及G α 蛋白ELISA检测方法

(57)摘要

本发明公开一种双齿围沙蚕G α 重组蛋白、多克隆抗体及G α 蛋白ELISA检测方法,是通过G α 开放阅读框设计特异性引物并通过PCR获得目的片段,构建了双齿围沙蚕G α 蛋白的原核表达系统,获得了纯化的双齿围沙蚕G α 重组蛋白,制备了其多克隆抗体,并建立了双齿围沙蚕G α 蛋白的ELISA检测方法,可利用方法简单、特异性强的ELISA技术测定双齿围沙蚕在环境雌激素污染下G α 蛋白的变化情况,可为环境雌激素对双齿围沙蚕毒性效应的机制提供实验基础及依据。



1. 一种双齿围沙蚕Ga重组蛋白,其特征在于依次按照如下方法制备:

a. 提取双齿围沙蚕总RNA,合成cDNA第一链;

b. 以双齿围沙蚕cDNA第一链为模板,进行PCR扩增反应,所述PCR反应的上游引物及下游引物的DNA序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示;

c. 对扩增产物1061bp切胶回收,将回收目的片段与pMD18-T连接,构建克隆质粒pMD18-T-Ga,将克隆质粒pMD18-T-Ga切胶回收后转化到感受态细胞DH5α中,挑取单克隆;

d. 将单克隆转到5mL Amp 100μg/mL LB液体培养基中,37℃ 200rpm 震荡过夜培养,抽提重组质粒pMD18-T-Ga;

e. 用限制性内切酶BamHI和Xho I分别消化重组质粒pMD18-T-Ga和质粒pET-28a,并切胶回收Ga目的片段与质粒pET-28a,将回收的Ga目的片段与质粒pET-28a按照摩尔比2.25:1的比例,以T4 DNA连接酶,16℃连接14h;切胶回收重组质粒pET-28a-Ga后转化到感受态细胞DH5α中,挑取单克隆;

f. 将单克隆转到5mL Amp 100μg/mL LB液体培养基中,37℃ 200rpm 震荡过夜培养,抽提重组质粒pET-28a-Ga;

g. 将重组质粒pET-28a-Ga转化到感受态细胞BL21 (DE3) 中,挑取平板中单一圆滑菌落于5mL Kan 40μg/mL LB液体培养基中,37℃,200rpm,震荡培养12~16h,从培养好的菌液中吸取4mL加入到200mL灭菌的Kan 40μg/mL LB液体培养基中,37℃,200rpm震荡培养至OD600nm在0.5~0.6;加入IPTG,使IPTG的终浓度为1.0mmol/L进行诱导表达,37℃,200rpm继续震荡培养4h,收集菌液;菌液于4℃,12000rpm离心5min,收集菌体;将所收集的菌体用PBS按照体积比5:1的比例清洗,4℃,12000rpm离心5min,共清洗2次,收集菌体;然后用含有1% Triton X-100的PBS对菌体进行重悬,重悬后进行超声波破碎,破碎后4℃,12000rpm离心30min弃去上清,沉淀用15mL PBS重悬,4℃保存;

h. 按照每100mL培养基所得菌体加入15mL洗涤液重悬沉淀,洗涤5min,4℃,12000rpm离心20min,共洗涤2次;再按照每100mL培养基所得菌体加入10mL变性液重悬沉淀,于4℃冰箱中过夜反应,直至变性液澄清,4℃,12000rpm离心20min,取上清于-20℃保存;

所述洗涤液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,2M尿素,PH7.9;

所述变性液:0.5 M NaCl,20mM Tris-HCl,8M尿素,PH7.9;

i. 选用Ni-NAT预装柱采用咪唑梯度纯化的方式对所得上清进行纯化,用1.5mL离心管收集洗脱缓冲液洗脱的目的蛋白,所用试剂的配制体系如下:

结合缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,20mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

漂洗缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,80mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,100mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

洗脱缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,1M咪唑,8M尿素,PH7.9;

j. 将纯化的蛋白收集起来,利用透析袋,采用梯度复性的方法进行蛋白复性:将装有纯化蛋白的透析袋放入2L复性缓冲液中,复性缓冲液按尿素浓度的不同,共设置5个浓度梯度,缓冲液的体系为:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,尿素6M,4M,2M,1M,0M,PH7.9,4℃磁力搅拌,透析8h;一个梯度透析之后再放入到下一梯度的透析缓冲液中透析,直到透析完成,收集蛋白4℃,12000g离心15min,收集上清弃去沉淀。

2. 一种以权利要求1所述双齿围沙蚕Ga重组蛋白制备的双齿围沙蚕Ga蛋白的多克隆抗

体,其特征在于按照如下方法制备:以40ug/kg的抗原剂量免疫新西兰兔,每隔3周免疫一次,共免疫4次;初次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕Ga重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀,后续3次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕Ga重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀;第4次免疫后7天采血,血液4℃静置直至分层,取血清,获得双齿围沙蚕Ga蛋白的多克隆抗体。

3.一种以权利要求2所述双齿围沙蚕Ga蛋白的多克隆抗体进行Ga蛋白ELISA检测方法,其特征在于依次按照如下步骤进行:

将被测蛋白用ELISA包被液稀释后,以每孔100uI加入到96孔板中,4℃包被过夜,倒掉包被液每孔100uI PBST洗涤3次;每孔加入200uI 3%牛血清蛋白37℃封闭4h,弃掉封闭液,每孔100uI PBST洗涤3次;每孔加入100 uI 1:4000稀释的双齿围沙蚕Ga蛋白的多克隆抗体,37℃孵育1h,弃掉双齿围沙蚕Ga蛋白的多克隆抗体,PBST清洗3次;每孔加入100 uI 1:4000稀释的羊抗兔IgG,37℃孵育1h,弃掉羊抗兔IgG,PBST清洗3次;每孔100uI ELISA显色液,室温避光显色10min后,加入50uI终止液,酶标仪450nm波长处检测吸光值。

双齿围沙蚕G α 重组蛋白、多克隆抗体及G α 蛋白ELISA检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,尤其涉及一种双齿围沙蚕G α 重组蛋白、多克隆抗体及G α 蛋白ELISA检测方法。

背景技术

[0002] G蛋白广泛存在于细胞膜上,并且参与胞内多种信号转导过程,在机体内发挥中重要的生理作用,激素、神经递质、气味、趋化因子等胞外信号首先刺激细胞膜上的相应的GPCRs,被激活的GPCRs再与G蛋白偶联,激活相应的细胞信号通路,产生相应的生物学效应。最新研究发现G蛋白及其偶联的雌激素受体介导了环境雌激素在生物体内的非基因组效应,这为利用G蛋白作为生物标志物进行环境雌激素效应的检测提供了可能性。双齿围沙蚕(*P. aibuhitensis*)隶属于环节动物门、多毛纲、沙蚕目,是一种栖息于潮间带地区沉积质中的底栖生物。与海洋鱼类不同,沙蚕作为一种底栖生物,其食腐殖质的食性和不易远距离迁徙的生活习性,使得该物种极易接触到环境污染物,国内部分学者已开始利用该生物作为生态监测指示生物进行相关研究。

[0003] 酶联免疫法亦称ELISA法,是采用抗原与抗体的特异反应将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,用于定量测定,具有方法简单、特异性强等特点。然而,由于目前关于G蛋白体外表达的报道多集中在无脊椎动物昆虫的G蛋白表达或是病毒G蛋白的表达,而对于双齿围沙蚕G α 蛋白的体外诱导表达及多克隆抗体的制备还未见报道,以至于无法采用ELISA法深入研究双齿围沙蚕在环境雌激素污染下的分子水平转录机制。

发明内容

[0004] 本发明是为了解决现有技术所存在的上述技术问题,提供一种双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体及G α 蛋白ELISA检测方法。

[0005] 本发明的技术解决方案是:一种双齿围沙蚕G α 重组蛋白,其特征在于依次按照如下方法制备:

- a. 提取双齿围沙蚕总RNA,合成cDNA第一链;
- b. 以双齿围沙蚕cDNA第一链为模板,进行PCR扩增反应,所述PCR反应的上游引物及下游引物的DNA序列分别如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2所示;
- c. 对扩增产物1061bp切胶回收,将回收目的片段与pMD18-T连接,构建克隆质粒pMD18-T-G α ,将克隆质粒pMD18-T-G α 切胶回收后转化到感受态细胞DH5 α 中,挑取单克隆;
- d. 将单克隆转到5mL Amp 100 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200rpm 震荡过夜培养,抽提重组质粒pMD18-T-G α ;
- e. 用限制性内切酶BamH I 和Xho I 分别消化重组质粒pMD18-T-G α 和质粒pET-28a,并切胶回收G α 目的片段与质粒pET-28a,将回收的G α 目的片段与质粒pET-28a按照摩尔比2.25:1的比例,以T4 DNA连接酶,16 $^{\circ}$ C连接14h;切胶回收重组质粒pET-28a-G α 后转化到感受态细胞DH5 α 中,挑取单克隆;

f. 将单克隆转到5mI Amp 100 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C200rpm 震荡过夜培养,抽提重组质粒pET-28a-G α ;

g. 将重组质粒pET-28a-G α 转化到感受态细胞BL21 (DE3)中,挑取平板中单一圆滑菌落于5mI Kan 40 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm,震荡培养12~16h,从培养好的菌液中吸取4mI加入到200mI灭菌的Kan 40 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm震荡培养至OD600nm在0.5~0.6;加入IPTG,使IPTG的终浓度为1.0mmol/L进行诱导表达,37 $^{\circ}$ C,200rpm继续震荡培养4h,收集菌液;菌液于4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心5min,收集菌体;将所收集的菌体用PBS按照体积比5:1的比例清洗,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心5min,共清洗2次,收集菌体;然后用含有1% Triton X-100的PBS对菌体进行重悬,重悬后进行超声波破碎,破碎后4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min弃去上清,沉淀用15mI PBS重悬,4 $^{\circ}$ C保存;

h. 按照每100mI培养基所得菌体加入15mI洗涤液重悬沉淀,洗涤5min,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心20min,共洗涤2次;再按照每100mI培养基所得菌体加入10mI变性液重悬沉淀,于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜反应,直至变性液澄清,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心20min,取上清于-20 $^{\circ}$ C保存;

所述洗涤液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,2M尿素,PH7.9;

所述变性液:0.5 M NaCl,20mM Tris-HCl,8M尿素,PH7.9;

i. 选用Ni-NAT预装柱采用咪唑梯度纯化的方式对所得上清进行纯化,用1.5mI离心管收集洗脱缓冲液洗脱的目的蛋白,所用试剂的配制体系如下:

结合缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,20mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

漂洗缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,80mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,100mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

洗脱缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,1M咪唑,8M尿素,PH7.9;

j. 将纯化的蛋白收集起来,利用透析袋,采用梯度复性的方法进行蛋白复性:将装有纯化蛋白的透析袋放入2L复性缓冲液中,复性缓冲液按尿素浓度的不同,共设置5个浓度梯度,缓冲液的体系为:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,尿素6M,4M,2M,1M,0M,PH7.9,4 $^{\circ}$ C磁力搅拌,透析8h;一个梯度透析之后再放入到下一梯度的透析缓冲液中透析,直到透析完成,收集蛋白4 $^{\circ}$ C,12000g离心15min,收集上清弃去沉淀。

[0006] 一种以上述双齿围沙蚕G α 重组蛋白制备的双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体,其特征在于按照如下方法制备:以40 μ g/kg的抗原剂量免疫新西兰兔,每隔3周免疫一次,共免疫4次;初次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕G α 重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀,后续3次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕G α 重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀;第4次免疫后7天采血,血液4 $^{\circ}$ C静置直至分层,取血清,获得双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体。

[0007] 一种以上述双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体进行G α 蛋白ELISA检测方法,其特征在于依次按照如下步骤进行:

将被测蛋白用ELISA包被液稀释后,以每孔100 μ I加入到96孔板中,4 $^{\circ}$ C包被过夜,倒掉包被液每孔100 μ I PBST洗涤3次;每孔加入200 μ I 3%牛血清蛋白37 $^{\circ}$ C封闭4h,弃掉封闭液,每孔100 μ I PBST洗涤3次;每孔加入100 μ I 1:4000稀释的双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃掉双齿围沙蚕G α 蛋白的多克隆抗体,PBST清洗3次;每孔加入100 μ I 1:4000稀释的羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C孵育1h,弃掉羊抗兔IgG,PBST清洗3次;每孔100 μ I ELISA显色液,室温避光显色10min后,加入50 μ I终止液,酶标仪450nm波长处检测吸光值。

[0008] 本发明通过在Ga开放阅读框两端设计引物获得了Ga的开放阅读框全长片段,构建了Ga蛋白的大肠杆菌原核表达体系,首次在体外诱导表达了双齿围沙蚕Ga蛋白,从而首次获得了双齿围沙蚕Ga多克隆抗体,并建立了双齿围沙蚕Ga蛋白的ELISA检测方法,利用方法简单、特异性强的ELISA技术测定双齿围沙蚕在环境雌激素污染下Ga蛋白的变化情况,可为环境雌激素对双齿围沙蚕毒性效应的机制提供实验基础及依据。

附图说明

- [0009] 图1为本发明实施例双齿围沙蚕总RNA经2%琼脂糖凝胶电泳图。
- [0010] 图2为本发明实施例双齿围沙蚕Ga基因扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳图。
- [0011] 图3为本发明实施例质粒pMD18-T-Ga经2%琼脂糖凝胶电泳图。
- [0012] 图4为本发明实施例质粒pMD18-T-Ga及质粒pET-28a双酶切经2%琼脂糖凝胶电泳图。
- [0013] 图5为本发明实施例重组质粒pET-28a-Ga经2%琼脂糖凝胶电泳图。
- [0014] 图6为本发明实施例Ga蛋白表达情况经SDS-PAGE电泳图。
- [0015] 图7为本发明实施例溶解后的包涵体Ga重组蛋白经SDS-PAGE电泳图。
- [0016] 图8为本发明实施例Ga重组蛋白纯化后经SDS-PAGE电泳图。
- [0017] 图9为本发明实施例Ga重组蛋白浓度测定的标准曲线。
- [0018] 图10为本发明实施例Ga多克隆抗体的Western Blot 检测结果示意图。
- [0019] 图11为本发明实施例双齿围沙蚕Ga蛋白的ELISA标准曲线。
- [0020] 图12为本发明实施例双齿围沙蚕Ga蛋白的ELISA检测方法检测不同浓度双酚A诱导雌性沙蚕体壁Ga蛋白表达量示意图。
- [0021] 图13为本发明实施例双齿围沙蚕Ga蛋白的ELISA检测方法检测不同浓度双酚A诱导雄性沙蚕体壁Ga蛋白表达量示意图。

具体实施方式

[0022] 实施例1:

本发明的双齿围沙蚕Ga重组蛋白,依次按照如下方法制备:

a. 剪取双齿围沙蚕体壁组织于液氮中研磨,使用RNAiso Plus提取沙蚕RNA,使用Takara Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H⁻)试剂盒合成cDNA第一链;所提取的双齿围沙蚕总RNA经2%琼脂糖凝胶电泳图如图1所示:图1中M为DL2000 DNA marker,1-3号泳道为双齿围沙蚕总RNA提取结果。

[0023] b. 根据Ga基因全长(Gene Bank:JQ914104)在开放阅读框两端(206bp-1267bp)设计合成特异性引物,上游引物5'端加入BamH^I酶切位点及保护碱基,DNA序列如SEQ ID NO:1所示,下游引物5'端加入Xho^I酶切位点及保护碱基,DNA序列如SEQ ID NO:2所示,以双齿围沙蚕cDNA第一链为模板,进行PCR扩增反应。双齿围沙蚕Ga基因扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳图如图2所示:图2中M为DL2000 DNA marker,1号泳道为Ga开放阅读框扩增产物;

c. 使用TIANGEN®琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒对扩增产物切胶回收片段,将回收目的片段(1061bp)与pMD18-T连接,构建克隆质粒pMD18-T-Ga,将克隆质粒pMD18-T-Ga切胶回收后转化到感受态细胞DH5α中,挑取单克隆;对单克隆进行测序,测序结果与Ga目的片段序列一

致。pMD18-T-G α 质粒经2%琼脂糖凝胶电泳图如图3所示：图3中M为DL5000 DNA marker,1号泳道为pMD18-T-G α 质粒提取结果；

d. 将单克隆转到5mL Amp 100 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200rpm 震荡过夜培养,使用TIANGEN[®]普通质粒小提试剂盒抽提重组质粒pMD18-T-G α

e. 用限制性内切酶BamH I和Xho I分别消化重组质粒pMD18-T-G α 和质粒pET-28a,并切胶回收G α 目的片段与质粒pET-28a,将回收的G α 目的片段与质粒pET-28a按照摩尔比2.25:1的比例,以T4 DNA连接酶,16 $^{\circ}$ C连接14h;切胶回收重组质粒pET-28a-G α 后转化到感受态细胞DH5 α 中,挑取单克隆;对所挑取的单克隆进行测序,测序结果与G α 目的片段序列一致。质粒pMD18-T-G α 及质粒pET-28a双酶切经2%琼脂糖凝胶电泳图如图4所示：图4中M为DL5000 DNA marker,1号泳道为pET-28a质粒双酶切结果,2号泳道为重组质粒pMD18-T-G α 双酶切结果。重组质粒pET-28a-G α 经2%琼脂糖凝胶电泳图如图5所示：图5中M为DL5000 DNA marker,1-2号泳道为pET-28a-G α 重组质粒提取结果；

f. 将所挑取的单克隆转到5mL Amp 100 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 200rpm 震荡过夜培养,使用TIANGEN[®]普通质粒小提试剂盒抽提重组质粒pET-28a-G α ；

g. 将重组质粒pET-28a-G α 转化到感受态细胞BL21 (DE3)中,挑取平板中单一圆滑菌落于5mL Kan 40 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm,震荡培养12~16h,从培养好的菌液中吸取4mL加入到200mL灭菌的Kan 40 μ g/mL LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200rpm震荡培养至OD600nm在0.5~0.6;加入IPTG,使IPTG的终浓度为1.0mmol/L进行诱导表达,37 $^{\circ}$ C,200rpm/min继续震荡培养4h,收集菌液;菌液于4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心5min,收集菌体;将所收集的菌体用PBS按照体积比5:1的比例清洗,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心5min,共清洗2次,收集菌体;然后用含有1%Triton X-100的PBS对菌体进行重悬,重悬后进行超声波破碎,破碎后4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心30min弃去上清,沉淀用15mL PBS重悬,4 $^{\circ}$ C保存。

[0024] 分别取空白对照菌液和诱导表达后菌液的全菌、上清和沉淀各20 μ L于PCR管中,加入5 μ L 5 $\times$ SDS Loading buffer,混合均匀,沸水中煮10min,恢复到室温后于聚丙烯酰胺上样SDS-PAGE电泳图如图6所示：图6中,M为蛋白Marker,1号泳道为诱导后破碎全菌蛋白表达情况,2号泳道为破碎上清蛋白表达情况,3号泳道为破碎沉淀蛋白表达情况。

[0025] 经考马斯亮蓝染色和脱色后判断重组蛋白G α 大量表达于沉淀中,以包涵体的形式存在。

[0026] h. 按照每100mL培养基所得菌体加入15mL洗涤液重悬沉淀,洗涤5min,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心20min,共洗涤2次;再按照每100mL培养基所得菌体加入10mL变性液重悬沉淀,于4 $^{\circ}$ C冰箱中过夜反应,直至变性液澄清,4 $^{\circ}$ C,12000rpm离心20min,取上清(溶解的变性蛋白)于-20 $^{\circ}$ C保存；

所述洗涤液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,2M尿素,PH7.9；

所述变性液:0.5 M NaCl,20mM Tris-HCl,8M尿素,PH7.9。

[0027] 溶解后的包涵体G α 重组蛋白经SDS-PAGE电泳图如图7所示:M为蛋白Marker,1号泳道为溶解后上清,2号泳道为溶解后沉淀；

i. 选用Ni-NAT预装柱采用咪唑梯度纯化的方式对所得上清(变性的溶解蛋白)进行纯化,用1.5mL离心管收集洗脱缓冲液洗脱的目的蛋白,所用试剂的配制体系如下：

结合缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,20mM咪唑,8M尿素,PH7.9；

漂洗缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,80mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,100mM咪唑,8M尿素,PH7.9;

洗脱缓冲液:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,1M咪唑,8M尿素,PH7.9。

[0028] 所收集的蛋白纯化后经SDS-PAGE电泳图如图8所示:M为蛋白Marker,1号泳道为纯化前蛋白样品,2号泳道为漂洗前收集液,3-4号泳道为80mM咪唑漂洗,5-6号泳道为100mM咪唑漂洗,7号泳道为1M咪唑洗脱。

[0029] j. 将纯化的蛋白收集起来,利用透析袋,采用梯度复性的方法进行蛋白复性:将装有纯化蛋白的透析袋放入2L复性缓冲液中,复性缓冲液按尿素浓度的不同,共设置5个浓度梯度,缓冲液的体系为:0.5M NaCl,20mM Tris-HCl,尿素6M,4M,2M,1M,0M,PH7.9,4℃磁力搅拌,透析8h;一个梯度透析之后再放入到下一梯度的透析缓冲液中透析,直到透析完成,收集蛋白4℃,12000g离心15min,收集上清弃去沉淀。

[0030] 使用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定所收集的上清中蛋白质浓度,调整蛋白浓度到1mg/ml,测定蛋白浓度所用标准曲线如图9。

[0031] 实施例2:

一种以上述双齿围沙蚕Gα重组蛋白制备的双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体,按照如下方法制备:以40ug/kg的抗原剂量免疫新西兰兔,每隔3周免疫一次,共免疫4次;初次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕Gα重组蛋白与等体积弗氏完全佐剂混匀,后续3次免疫所用抗原是将双齿围沙蚕Gα重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混匀;第4次免疫后7天采血,血液4℃静置直至分层,取血清,获得双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体。

[0032] Western Blot检测双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体的特异性:使用RIPA裂解液提取双齿围沙蚕的总蛋白,取20μl总蛋白加入5μl 5×SDS Loading buffer,混匀后沸水中煮10min,之后进行SDS-PAGE电泳,120V转膜35min,完成后用3%BSA,4℃封闭过夜,加入1:4000稀释的本发明实施例2的双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体,37℃孵育1h,TBS清洗3次,加入1:4000稀释的羊抗体IgG,37℃孵育1h,TBS清洗3次,DAB试剂盒显色5-10min,ddH₂O清洗3次,干燥后观察显色情况。

[0033] 结果如图10所示:图10中M为蛋白Marker,1号泳道为Western Blot鉴定结果。

[0034] 结果表明:目的条带所处位置出现显色条带,表明所制备的抗体与沙蚕体内Gα蛋白可以有效结合,证明所制备的多克隆抗体可以用来检测沙蚕体内G蛋白的存在。

[0035] 实施例3:

本发明的Gα蛋白ELISA检测方法,依次按照如下步骤进行:

将被测蛋白用ELISA包被液稀释后,以每孔100uI加入到96孔板中,4℃包被过夜,刺入倒掉包被液每孔100uI PBST洗涤3次;每孔加入200uI 3%牛血清蛋白37℃封闭4h,弃掉封闭液,每孔100uI PBST洗涤3次;每孔加入100 uI 1:4000稀释的双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体,37℃孵育1h,弃掉双齿围沙蚕Gα蛋白的多克隆抗体,PBST清洗3次;每孔加入100 uI 1:4000稀释的羊抗兔IgG,37℃孵育1h,弃掉羊抗兔IgG,PBST清洗3次;每孔100uI ELISA显色液,室温避光显色10min后,加入50uI终止液,酶标仪450nm波长处检测吸光值。

[0036] 实验例1:按照本发明实施例3的方法,将按浓度梯度稀释的本发明实施例Gα重组蛋白直接包被到96孔板中进行实验,酶标仪下测定OD₄₅₀的值。以净吸光值(阳性OD₄₅₀-阴性OD₄₅₀)为横坐标,各Gα重组蛋白浓度的对数为纵坐标绘制Gα重组蛋白的间接ELISA测定

标准曲线,如图11所示。其中,蛋白浓度为6.25ng/ml时,其吸光值不在线性范围内,所以舍弃该组数据。标准曲线 $R^2=0.9903$,具有良好的线性关系,G α 的测定范围为12.5~400ng。

[0037] 实验例2:利用环境雌激素双酚A分别诱导雌性、雄性双齿围沙蚕,分别在4d、7d、14d时提取沙蚕体壁总蛋白,利用本发明实施例3的方法进行G α 蛋白含量的检测。检测结果如图12~13所示。图12~13中**表示与对照组相比差异极显著($p<0.01$);*表示与对照组相比差异显著($p<0.05$)

结果显示不同浓度双酚A均能导致沙蚕体内G α 蛋白含量出现显著变化,表明本发明实施例3方法可以及时的反应出机体对环境雌激素的响应机制。

序 列 表

<110> 大连海洋大学

<120> 双齿围沙蚕Gα重组蛋白、多克隆抗体及Gα蛋白ELISA检测方法

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 上游引物

<400> 1

TTGGATCCATGGCTTGCTGTCTGAG 25

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 下游引物

<400> 2

CGCTCGAGCACTAAGTTGTACTCTTTCAG 29

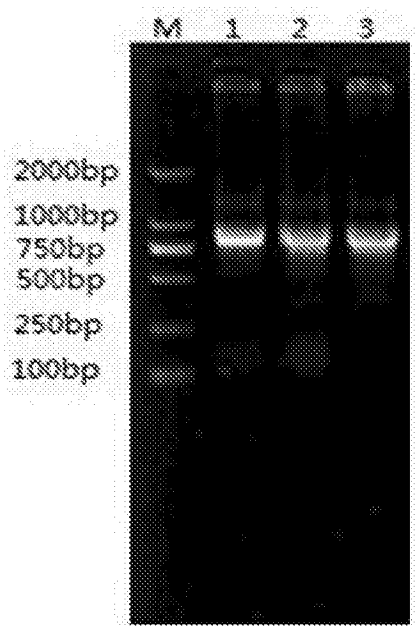


图1

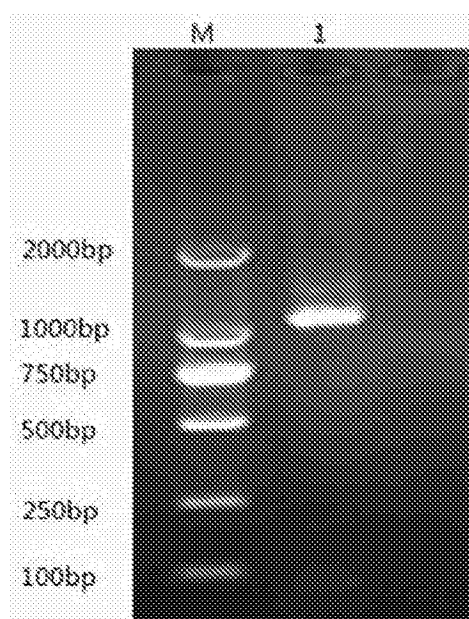


图2

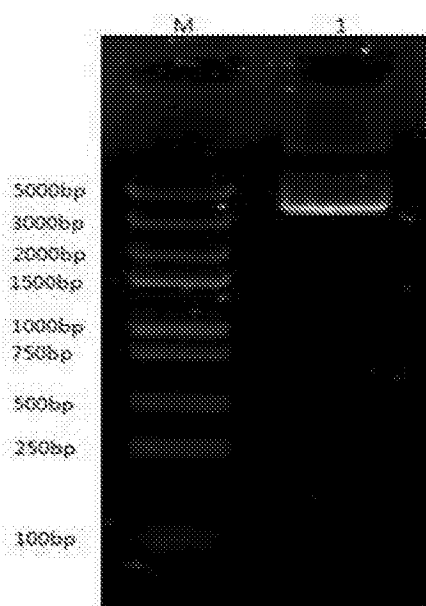


图3

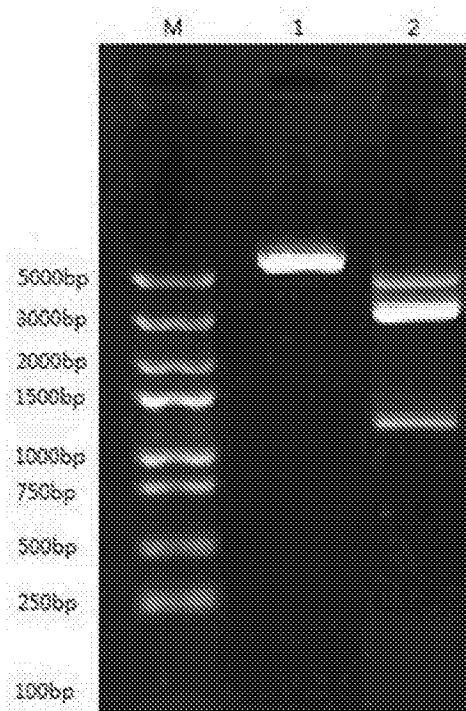


图4

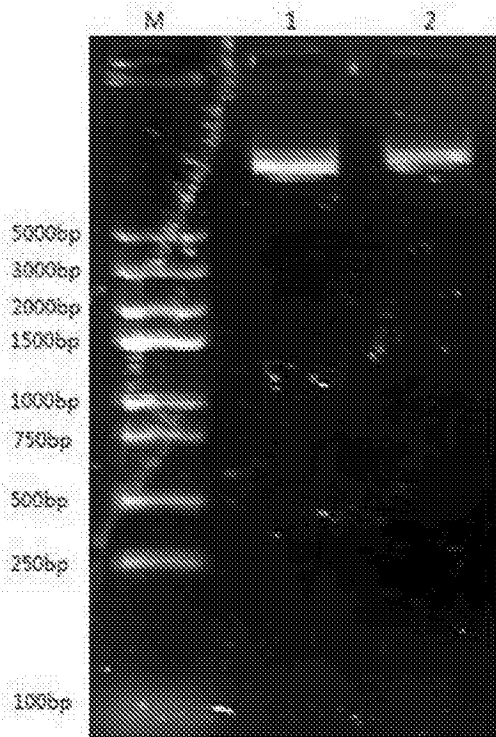


图5

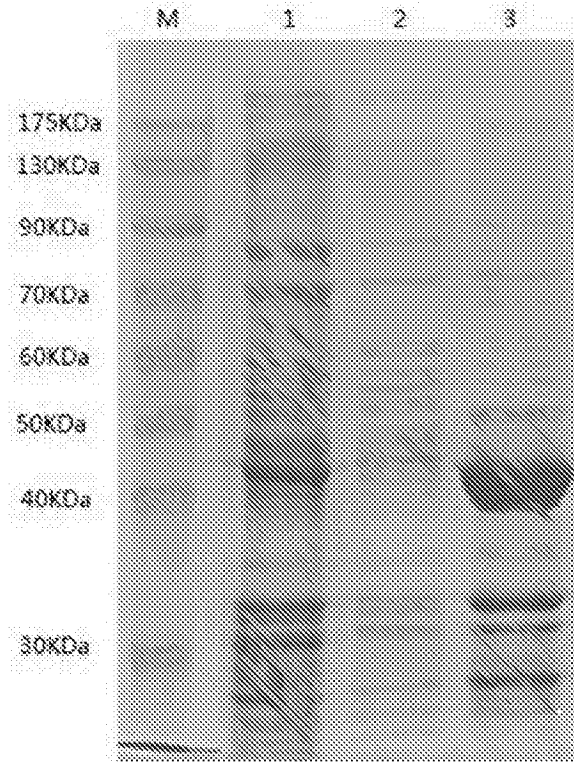


图6

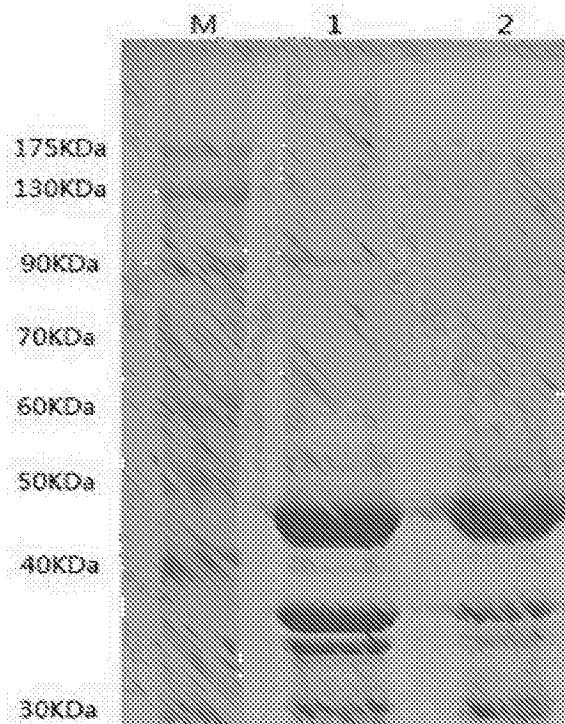


图7

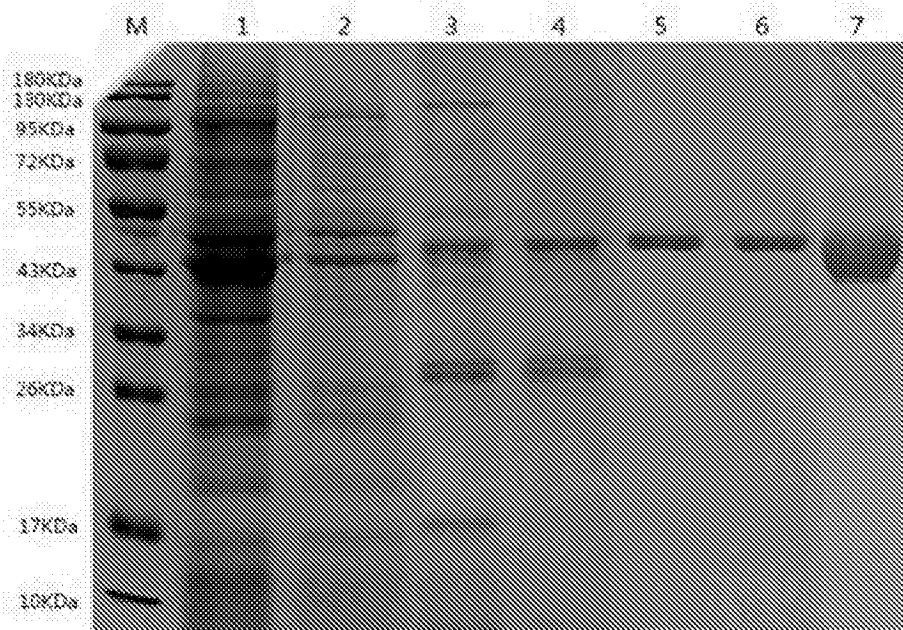


图8

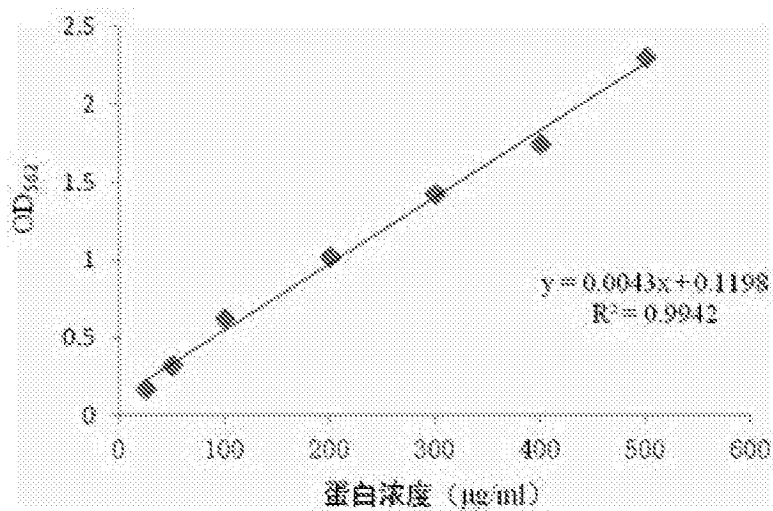


图9

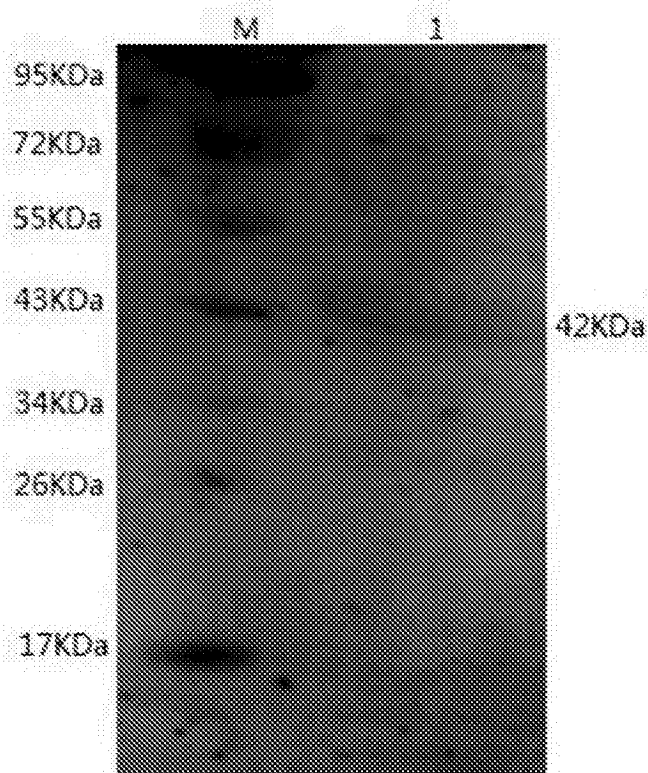


图10

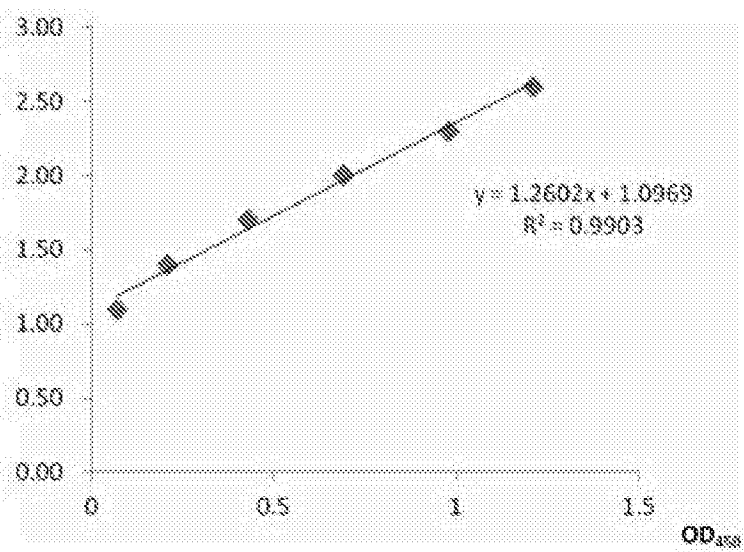


图11

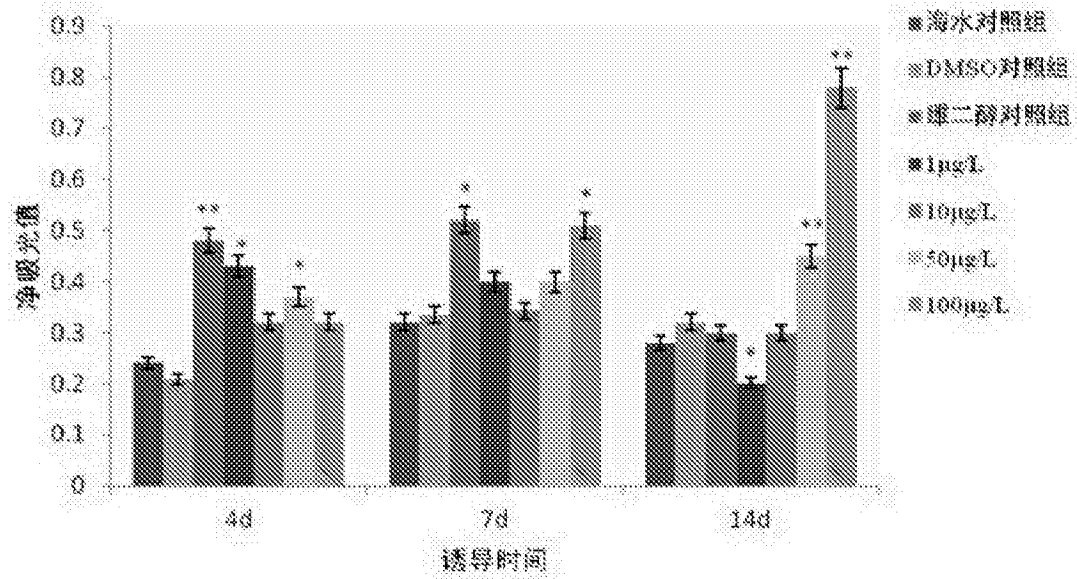


图12

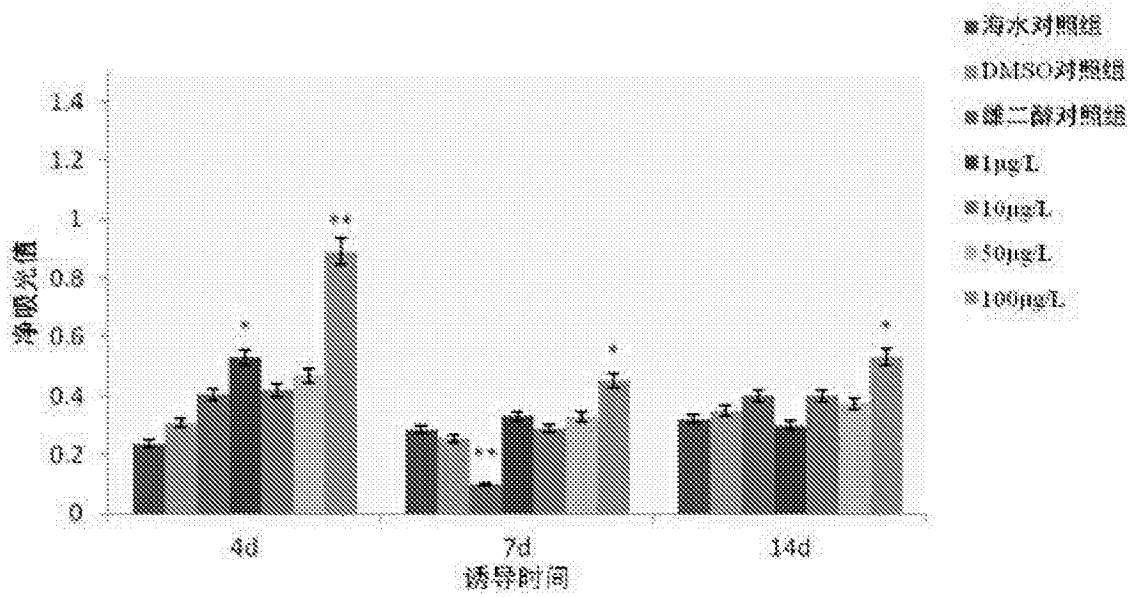


图13

专利名称(译)	双齿围沙蚕Gα重组蛋白、多克隆抗体及Gα蛋白ELISA检测方法		
公开(公告)号	CN106800596A	公开(公告)日	2017-06-06
申请号	CN201611161183.0	申请日	2016-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	大连海洋大学		
[标]发明人	赵欢 周一兵 李娜 杨大佐 赵子涵		
发明人	赵欢 周一兵 李娜 杨大佐 赵子涵		
IPC分类号	C07K14/435 C12N15/70 C07K16/18 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/43586 C07K16/18 C07K2317/10 C12N15/70 C12N2800/101 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种双齿围沙蚕Gα重组蛋白、多克隆抗体及Gα蛋白ELISA检测方法，是通过Gα开放阅读框设计特异性引物并通过PCR获得目的片段，构建了双齿围沙蚕Gα蛋白的原核表达系统，获得了纯化的双齿围沙蚕Gα重组蛋白，制备了其多克隆抗体，并建立了双齿围沙蚕Gα蛋白的ELISA检测方法，可利用方法简单、特异性强的ELISA技术测定双齿围沙蚕在环境雌激素污染下Gα蛋白的变化情况，可为环境雌激素对双齿围沙蚕毒性效应的机制提供实验基础及依据。

