



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108918861 A

(43)申请公布日 2018.11.30

(21)申请号 201810236389.8

(22)申请日 2018.03.21

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市下沙高教园区2
号大街928号

(72)发明人 王秉 李津 梁军龙 陈茹茹
何宇杰

(74)专利代理机构 浙江纳祺律师事务所 33257
代理人 郑满玉

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

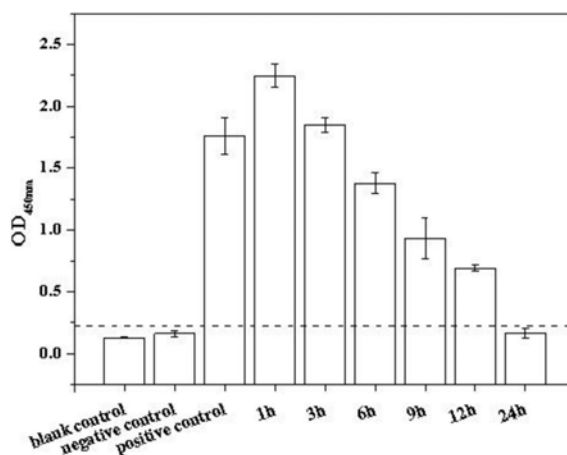
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级
结构变化的方法

(57)摘要

本发明公开的是一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,属于蛋白质结构领域,采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化,碱老化结束以后将PH调节为中性,对溶液进行过滤,透析,冷冻干燥,研磨等操作后,利用研磨所得的粉末进行间接ELISA实验,根据实验结果,得到了桑蚕丝素蛋白的一个特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂条件,同时对研究在碱老化过程中,整个蛋白质大分子链结构的变化状况也具有一定意义。



1. 一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于包括如下制备步骤:

A) 取10-15g桑蚕丝生丝置于烧杯中,加入1000-1500ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在94-98℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作,然后将烧杯中剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

B) 取1-1.5g步骤A) 所得的桑蚕丝置于烧杯,剪碎后加入100-150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4-6小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得制备碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

E) 分别取1-2mg步骤C) 和步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末,将其分别放入15ml离心管中,每支离心管加入10mlPH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液;

F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100μl步骤E) 中所得包被液,所述酶标板中的每列加五个孔,该五个孔中均加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时的顺序完成布板;

G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200μl的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200μl的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200μl的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100μl的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200μl的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100μl的HRP标记的山羊抗兔抗体,37℃下孵育1h;每孔加入200μl的pH7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50μl的TMB显色的剂A液,再加入50μl的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100μl的H₂SO₄终止反应,测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm}。

2. 如权利要求1所述的一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于,步骤E) 中所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6。

3. 如权利要求1所述的一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于,所述空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白特征多肽一抗加入,所述阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,所述阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被。

4. 如权利要求1所述的一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于,步骤G) 中所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全

部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4。

5.如权利要求1所述的一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于,步骤G)中所述兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS特征序列抗体。

6.如权利要求5所述的一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,其特征在于,根据所述间接酶联免疫测试结果以判断特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂时间。

一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质结构领域,尤其涉及一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法。

背景技术

[0002] 桑蚕丝是一种天然高分子蛋白质纤维,我国是最早养蚕缫丝织绸的国家,但桑蚕丝的起源问题一直笼罩在迷雾中。解决我国桑蚕丝起源的问题不仅仅是探索华夏文明起源的需要,而且也是为“我国是世界上公认的丝绸起源地”这一说法提供更加信服的证据。当前蛋白质检测的先进技术是基于抗体-抗原的ELISA法,目前已出现了桑蚕丝素蛋白的多克隆抗体,可以检测出含量较小的桑蚕丝素蛋白。但目前利用ELISA法对桑蚕丝进行检测时,往往都是对种属进行区分,也就是确定待测样品是否为桑蚕丝,而对丝素蛋白一级结构进行探究,甚至是初步探究的ELISA方法至今仍未建立。

发明内容

[0003] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,本发明方法利用氢氧化钠对桑蚕丝进行碱老化,制备出了不同老化时间的桑蚕丝素蛋白碱老化样,并确定了丝素蛋白中一个特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂条件。

[0004] 为了实现上述目的,本发明是通过以下技术方案实现的:

[0005] 一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法,包括如下制备步骤:

[0006] A) 取10-15g桑蚕丝生丝置于烧杯中,加入1000-1500ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在94-98℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作,然后将烧杯中剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0007] B) 取1-1.5g步骤A) 所得的桑蚕丝置于烧杯,剪碎后加入100-150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0008] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4-6小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0009] D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得制备碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0010] E) 分别取1-2mg步骤C) 和步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末,将其分别放入15ml离心管中,每支离心管加入10mlPH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液;

[0011] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100μl步骤E) 中所得包被液,所述酶标板中的每列加五个孔,该五个孔中均加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12

小时,碱老化24小时的顺序完成布板;

[0012] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μ l的1wt%的牛血清蛋白溶液,37 $^{\circ}$ C下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应,测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm}。

[0013] 作为一种改进,步骤E) 中所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6。

[0014] 作为一种改进,所述空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白特征多肽一抗加入,所述阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,所述阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被。

[0015] 作为一种改进,其特征在于,步骤G) 中所述的pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4。

[0016] 作为一种改进,其特征在于,步骤G) 中所述的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS这一特征序列的抗体。

[0017] 作为一种改进,其特征在于,根据所述间接酶联免疫测试结果以判断特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂时间。

[0018] 与现有技术对比本发明的有益效果:

[0019] 1) 采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化,与传统的湿热老化方法相比,达到相同老化程度所需时间极大缩短,从数月降低到数小时,且碱老化结束以后立刻将PH调节为中性,精确控制老化时间,若不调节PH,则会出现透析过程中样品被二次老化的情况,使实验的准确性和说服力下降,同时在碱老化过程中采用磁力搅拌器匀速搅拌,将脱胶后的桑蚕丝先剪碎再加入氢氧化钠溶液,可减少在搅拌过程中样品相互缠绕的程度,同时提高了老化的均匀程度,若不剪碎和搅拌,则容易出现样品老化不均匀的现象,使重复实验结果偏差较大;

[0020] 2) 采用兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS这一特征序列的抗体,根据现有文献已知GAGAGSGAGAGS为桑蚕丝素蛋白中丰度最高的序列,对其进行探究对研究整个蛋白质的分子链结构也具有一定意义;

[0021] 3) 根据本发明进行的间接酶联免疫测试结果,得到GAGAGSGAGAGS的断裂条件,同时对碱老化过程中桑蚕丝素蛋白的一级结构变化也有了初步探究。

附图说明

[0022] 图1是本发明间接酶联免疫测试结果统计图。

具体实施方式

[0023] 以下通过具体的实施方式对本发明作进一步的说明,但本发明的实施方式并不受以下实施例的限制。

[0024] 如图1所示为本发明间接酶联免疫测试的结果统计图,图中虚线为阳性检出限,OD450nm低于该虚线则说明此样品检测不出阳性,从图中可以看出,碱老化时间为24小时的样品,其OD值低于阳性检出限,说明此时抗体无法检测到GAGAGSGAGAGS的存在,因此可将碱老化24小时作为特征序列肽段GAGAGSGAGAGS,同时这一序列具有很高的丰度,所以也可以近似认为此时桑蚕丝素蛋白的分子链大部分发生了断裂。

[0025] 实施例1

[0026] A) 取10g桑蚕丝生丝于烧杯,加入1000ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在94℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作。将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0027] B) 取1g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯,剪碎后加入100ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0028] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔4小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0029] D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末,加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间;

[0030] E) 分别取1mg步骤C) 和步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末,将其分别放入15ml离心管中,每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液,所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6;

[0031] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100μl步骤E) 中所得包被液,每列加五个孔,这五个孔加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时的顺序完成布板,所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白特征多肽一抗加入,阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被;

[0032] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200μl的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100μl的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200μl的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共

洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min,然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应,测试其在450nm处的吸光度,记为OD450nm。

[0033] 所述pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4;所述兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS这一特征序列的抗体,根据步骤G)中所述间接酶联免疫测试结果,判断特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂时间。

[0034] 实施例2

[0035] A) 取13g桑蚕丝生丝于烧杯,加入1300ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在94-98 $^{\circ}$ C水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作。将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60 $^{\circ}$ C的烘箱中烘干备用;

[0036] B) 取1.3g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯,剪碎后加入130ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25 $^{\circ}$ C下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0037] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔5小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0038] D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末,加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间;

[0039] E) 分别取1.5mg步骤C) 和步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末,将其分别放入15ml离心管中,每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液,所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6;

[0040] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100 μ l步骤E) 中所得包被液,每列加五个孔,这五个孔加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时的顺序完成布板,所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白特征多肽一抗加入,阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被;

[0041] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μ l的1wt%的牛血清蛋白溶液,37 $^{\circ}$ C下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,

再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min。然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应。测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm}。

[0042] 所述pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4;所述兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS这一特征序列的抗体,根据步骤G)中所述间接酶联免疫测试结果,判断特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂时间。

[0043] 实施例3

[0044] A) 取15g桑蚕丝生丝于烧杯,加入1500ml的0.5%Na₂CO₃溶液,在98℃水浴中加热30min,倒掉烧杯中的溶液,重复进行一次上述操作。将剩余的桑蚕丝用去离子水冲洗3遍,置于60℃的烘箱中烘干备用;

[0045] B) 取1.5g步骤A) 所得的桑蚕丝于烧杯,剪碎后加入150ml浓度为2.5mol/L的NaOH溶液,在25℃下置于10转/秒的磁力搅拌器上,匀速搅拌1小时后,加入冰醋酸调节PH至7;

[0046] C) 将步骤B) 所得的溶液过滤,用分子截留量为8000的透析袋进行透析,每隔6小时换一次水,透析3天后,将透析袋内剩余溶液冷冻干燥并研磨,得到碱老化1小时的桑蚕丝素蛋白粉末;

[0047] D) 重复步骤B)、步骤C),分别制备获得碱老化3小时,6小时,9小时,12小时,24小时的桑蚕丝素蛋白粉末,加碱至PH中和为7过程中的时间为碱老化时间;

[0048] E) 分别取2mg步骤C) 和步骤D) 所制得的桑蚕丝素蛋白粉末,将其分别放入15ml离心管中,每支离心管加入10ml PH为9.6的碳酸盐缓冲溶液,震荡均匀后得到澄清的包被液,所述的PH9.6的碳酸盐缓冲溶液,其配制方法为:称取1.5g碳酸钠和2.9g碳酸氢钠,加入到800ml去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000ml的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为9.6;

[0049] F) 取一块96孔酶标板,每孔加入100 μ l步骤E) 中所得包被液,每列加五个孔,这五个孔加入同一种包被液,列与列之间使用不同的包被液,按照空白对照,阴性对照,阳性对照,碱老化1小时,碱老化3小时,碱老化6小时,碱老化9小时,碱老化12小时,碱老化24小时的顺序完成布板,所述的空白对照为采用1wt%的牛血清蛋白溶液代替兔抗丝素蛋白特征多肽一抗加入,阴性对照为采用碳酸盐缓冲溶液进行包被,阳性对照为采用未老化丝素蛋白配得的溶液进行包被;

[0050] G) 对步骤F) 中布置好的96孔板进行间接酶联免疫测试,其具体步骤为:每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入200 μ l的1wt%的牛血清蛋白溶液,37℃下孵育2h,进行封闭处理;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,37℃下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4的磷酸盐缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤3次,然后每孔加入100 μ l的HRP标记的山羊抗兔抗体,37℃下孵育1h;每孔加入200 μ l的pH 7.4缓冲溶液进行洗涤,每次2分钟,共洗涤5次,然后每孔加入50 μ l的TMB显色的剂A液,再加入50 μ l的TMB显色剂的B液,摇晃均匀,避光反应10min。然后每孔加入100 μ l的H₂SO₄终止反应。测试其在450nm处的吸光度,记为OD_{450nm}。

[0051] 所述pH7.4的磷酸盐缓冲溶液的配制方法为:称取0.27g磷酸二氢钾,1.42g磷酸氢二钠,8g氯化钠和0.2g氯化钾,加入到800mL去离子水中,然后混合搅拌直到全部溶解,用1000mL的容量瓶进行定容,调节溶液的pH为7.4;所述兔抗丝素蛋白特征多肽一抗,其特征多肽序列为GAGAGSGAGAGS,制备抗体时采用偶联GAGAGSGAGAGS的钥孔血蓝蛋白作为免疫原对兔子进行注射,得到能特异性识别GAGAGSGAGAGS这一特征序列的抗体,根据步骤G)中所述间接酶联免疫测试结果,判断特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂时间。

[0052] 本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0053] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

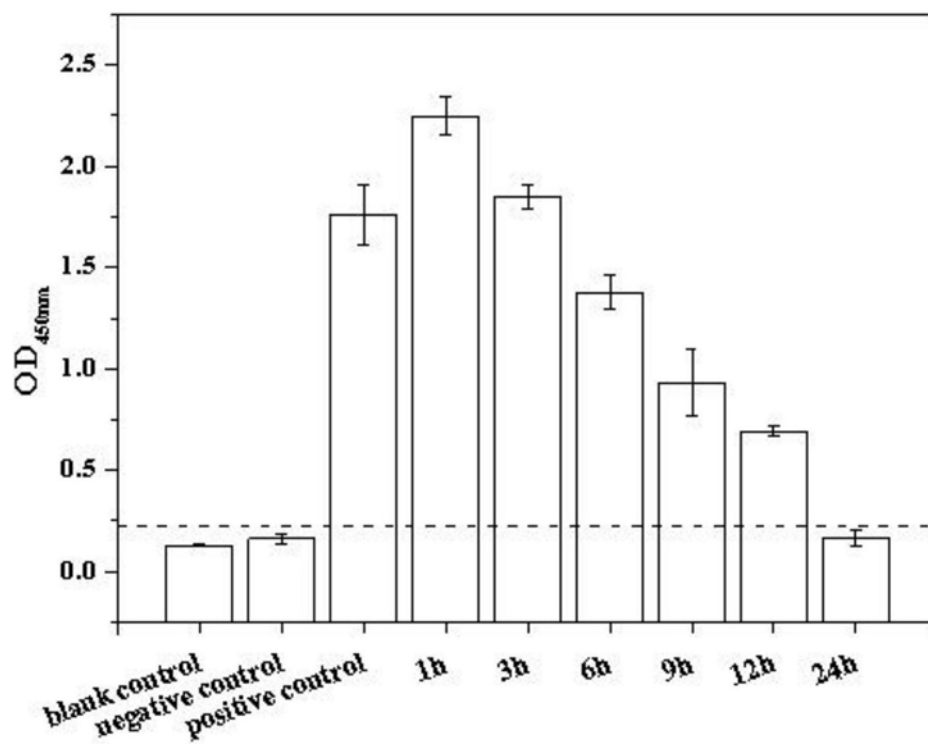


图1

专利名称(译)	一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法		
公开(公告)号	CN108918861A	公开(公告)日	2018-11-30
申请号	CN201810236389.8	申请日	2018-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江理工大学		
[标]发明人	王秉 李津 梁军龙 陈茹茹 何宇杰		
发明人	王秉 李津 梁军龙 陈茹茹 何宇杰		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开的是一种探究碱老化过程中桑蚕丝素蛋白一级结构变化的方法，属于蛋白质结构领域，采用氢氧化钠对桑蚕丝进行老化，碱老化结束以后将PH调节为中性，对溶液进行过滤，透析，冷冻干燥，研磨等操作后，利用研磨所得的粉末进行间接ELISA实验，根据实验结果，得到了桑蚕丝素蛋白的一个特征序列GAGAGSGAGAGS的断裂条件，同时对研究在碱老化过程中，整个蛋白质大分子链结构的变化状况也具有一定意义。

