



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111363789 A

(43)申请公布日 2020.07.03

(21)申请号 201811596144.2

(22)申请日 2018.12.25

(71)申请人 中山大学孙逸仙纪念医院
地址 510000 广东省广州市沿江西路107号
中山大学孙逸仙纪念医院

(72)发明人 李建明 倪雯 姚溯 周云侠

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202

代理人 颜希文 宋静娜

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6841(2018.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

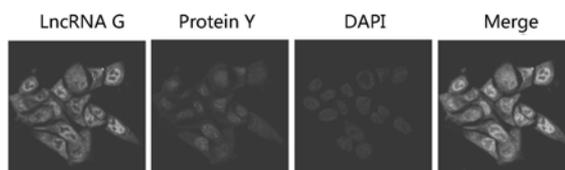
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒和方法

(57)摘要

本发明公开了一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒,所述试剂盒包括固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗和DAPI复染封片剂;本发明还公开了一种同时检测蛋白质和RNA的方法。采用本发明的检测试剂盒和方法,能在同一组织或细胞水平同时检测蛋白质与RNA的共定位表达,通过荧光显微镜可直观的观察蛋白质与RNA的表达情况。



1. 一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗和DAPI复染封片剂。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述固定液为4% (W/W) 的多聚甲醛,其中含有1/1000 (W/W) DEPC。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述胃蛋白酶的使用浓度为5ug/ml。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述杂交液含有0.01M PBS,0.05% (W/W) Tween,1% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述封闭液含有0.01M PBS,0.1% (W/W) Tween,2% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述生物素化地高辛为生物素化鼠抗地高辛。

7. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述荧光一抗为Alexa Fluor®647标记的荧光一抗。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述荧光二抗为SABC-FITC标记的荧光二抗。

9. 一种同时检测蛋白质和RNA的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取细胞爬片室温固定,固定液为4% (W/W) 多聚甲醛,其中含有1/1000DEPC;

(2) 暴露mRNA核酸片段:向步骤(1)所得细胞爬片上滴加柠檬酸稀释的胃蛋白酶,37°C或室温消化,清洗;

(3) 预杂交:干的杂交盒底部加甘油以保持湿度,按每张步骤(2)所得细胞爬片加40μL杂交液,恒温箱40°C、2小时,之后吸取多余液体;

(4) 杂交:用杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针,按每张步骤(3)所得细胞爬片加50μL杂交液,将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开,盖在切片上,恒温箱40°C杂交过夜;

(5) 杂交后洗涤:40°C水温和的2×SSC洗涤步骤(4)所得细胞爬片5分钟×2次;0.5×SSC洗涤15分钟×1次;0.2×SSC洗涤15分钟×1次;

(6) 封闭:向步骤(5)所得细胞爬片加入封闭液,在37°C反应30分钟;

(7) 向步骤(6)所得细胞爬片滴加生物素化鼠抗地高辛:37°C反应60min,避光;

(8) 步骤(7)所得细胞爬片用PBS清洗后,荧光二抗用PBS稀释,向细胞爬片滴加稀释后的荧光二抗,之后37°C反应30分钟;

(9) 步骤(8)所得细胞爬片用PBS清洗后,加入免疫荧光直标荧光一抗孵育60min,37°C、避光;之后PBS清洗,再利用含DAPI染色剂封片,然后用荧光显微镜观察细胞爬片,即得。

一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物大分子检测技术领域,尤其是一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒和方法。

背景技术

[0002] 蛋白质免疫荧光技术是指用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法,用于检测或定位各种抗原。

[0003] RNA FISH (RNA荧光原位杂交) 技术是将核酸探针的某一种核苷酸标记上一种报告分子(如生物素、地高辛),利用该报告分子与荧光素标记的特异亲和素之间的免疫化学反应,经荧光检测体系在镜下对待测RNA进行定性、定量或相对定位分析的过程。RNA FISH可提供RNA在组织细胞的空间表达信息。

[0004] 但是目前,临床上还不能在一个样品同时检测蛋白质和RNA的表达。现有技术无法结合蛋白质免疫荧光和RNA FISH技术,从而实现在同一组织或细胞水平同时检测蛋白质与RNA的共定位表达。

发明内容

[0005] 基于上述问题,本发明的目的在于克服上述现有技术的不足之处而提供一种同时检测蛋白质和RNA的方法,采用该方法能在同一组织或细胞水平同时检测蛋白质与RNA的共定位表达。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案包括以下内容:

[0007] 在第一个方面,本发明提供了一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒,所述试剂盒包括固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗和DAPI复染封片剂。

[0008] 优选地,所述固定液为4% (W/W) 的多聚甲醛,其中含有1/1000 (W/W) DEPC。

[0009] 优选地,所述胃蛋白酶的使用浓度为5ug/ml。

[0010] 优选地,所述杂交液含有0.01M PBS,0.05% (W/W) Tween,1% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA。

[0011] 优选地,所述封闭液含有0.01M PBS,0.1% (W/W) Tween,2% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA。

[0012] 优选地,所述生物素化地高辛为生物素化鼠抗地高辛。

[0013] 优选地,所述荧光一抗为AlexaFluor®647标记的荧光一抗。

[0014] 优选地,所述荧光二抗为SABC-FITC标记的荧光二抗。

[0015] 在第二个方面,本发明提供了一种同时检测蛋白质和RNA的方法,包括如下步骤:

[0016] (1) 取细胞爬片室温固定,固定液为4% (W/W) 多聚甲醛,其中含有1/1000DEPC;

[0017] (2) 暴露mRNA核酸片段:向步骤(1)所得细胞爬片上滴加柠檬酸稀释的胃蛋白酶,37°C或室温消化,清洗;

[0018] (3) 预杂交:干的杂交盒底部加甘油以保持湿度,按每张步骤(2)所得细胞爬片加40 μ L杂交液,恒温箱40 $^{\circ}$ C、2小时,之后吸取多余液体;

[0019] (4) 杂交:用杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针,按每张步骤(3)所得细胞爬片加50 μ L杂交液,将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开,盖在切片上,恒温箱40 $^{\circ}$ C杂交过夜;

[0020] (5) 杂交后洗涤:40 $^{\circ}$ C水温的2 \times SSC洗涤步骤(4)所得细胞爬片5分钟 \times 2次;0.5 \times SSC洗涤15分钟 \times 1次;0.2 \times SSC洗涤15分钟 \times 1次;

[0021] (6) 封闭:向步骤(5)所得细胞爬片加入封闭液,在37 $^{\circ}$ C反应30分钟;

[0022] (7) 向步骤(6)所得细胞爬片滴加生物素化鼠抗地高辛:37 $^{\circ}$ C反应60min,避光;

[0023] (8) 步骤(7)所得细胞爬片用PBS清洗后,荧光二抗用PBS稀释,向细胞爬片滴加稀释后的荧光二抗,之后37 $^{\circ}$ C反应30分钟;

[0024] (9) 步骤(8)所得细胞爬片用PBS清洗后,加入免疫荧光直标荧光一抗孵育60min,37 $^{\circ}$ C、避光;之后PBS清洗,再利用含DAPI染色剂封片,然后用荧光显微镜观察细胞爬片,即得。

[0025] 综上所述,本发明的有益效果为:

[0026] 本发明实现了在同一组织或细胞水平同时检测蛋白质与RNA的共定位表达,可通过荧光显微镜直观的观察蛋白质与RNA的表达情况。

附图说明

[0027] 图1为细胞爬片中RNA和/或蛋白质在荧光显微镜下的照片。

具体实施方式

[0028] 本发明属于生物医学临床检验领域,具体涉及一种应用蛋白质免疫荧光结合RNA FISH共染的试剂盒及其应用,其中,试剂盒包括:固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗、DAPI复染封片剂。

[0029] 本发明采用免疫荧光抗体联合RNA寡核苷酸探针对细胞内蛋白质和核酸进行共定位检测,在同一细胞或者组织实现蛋白质免疫荧光和RNA FISH共染,克服了免疫荧光检测和RNA FISH检测联合使用存在的相互干扰、信号弱的问题,且操作简单,经济实惠,为直观的检测蛋白质与RNA共定位提供了有效的手段。

[0030] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。如无特别说明,本发明中的试剂浓度均为质量浓度;如无特别说明,本发明中的实验方法均为常规方法。

[0031] 实施例1

[0032] 本发明中同时检测蛋白质和RNA的试剂盒的一种实施例,包括固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗和DAPI复染封片剂;

[0033] 其中,固定液为4% (W/W) 的多聚甲醛,其中含有1/1000 (W/W) DEPC;胃蛋白酶的使用浓度为5 μ g/ml;杂交液含有0.01M PBS,0.05% (W/W) Tween,1% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA;封闭液含有0.01M PBS,0.1% (W/W) Tween,2% (W/W) 羊血清和1% (W/W) BSA;生物素化地高辛为生物素化鼠抗地高辛;荧光一抗为Alexa Fluor $^{\text{®}}$ 647标记的荧光一抗;荧光二抗为

SABC-FITC标记的荧光二抗。

[0034] 实施例2

[0035] 本发明中同时检测蛋白质和RNA的方法的一种实施例,包括如下步骤:

[0036] (1) 固定:取结肠癌细胞爬片,加入固定液;其中,固定液为4% (W/W) 多聚甲醛,含有1/1000 (W/W) DEPC,室温固定30分钟;

[0037] (2) 暴露mRNA核酸片段:细胞爬片上滴加3%柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1ml 3%柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶,混匀,胃蛋白酶浓度为5ug/ml),37℃或室温消化2分钟;0.5M PBS洗3次×5分钟,蒸馏水洗1次;

[0038] (3) 预杂交:湿盒的准备—干的杂交盒底部加20%甘油20ml以保持湿度;按每张细胞爬片加40u1杂交液;恒温箱40℃2小时;吸取多余液体,不洗;

[0039] (4) 杂交:用杂交液稀释地高辛标记的寡核苷酸探针,浓度为0.5-2μg/ml (500uM);按每张细胞爬片加50u1杂交液;将原位杂交专用盖玻片的保护膜揭开后,盖在细胞爬片上,恒温箱40℃杂交过夜(16H);

[0040] (5) 杂交后洗涤:40℃水温的2×SSC洗涤细胞爬片5分钟×2次;0.5×SSC洗涤15分钟×1次;0.2×SSC洗涤15分钟×1次;必要时,可重复0.2×SSC洗涤1次;

[0041] (6) 封闭:向细胞爬片添加封闭液,37℃反应30分钟,甩去多余液体,不洗;

[0042] (7) 滴加生物素化鼠抗地高辛:向细胞爬片滴加生物素化鼠抗地高辛,37℃反应60min,避光;

[0043] (8) PBS洗细胞爬片5分钟×3次;

[0044] (9) 滴加荧光二抗:取1u1荧光二抗,用原位杂交用PBS稀释为100u1,每张细胞爬片加50u1,37℃反应30分钟;

[0045] (10) PBS洗细胞爬片5分钟×3次,勿用其它缓冲液和蒸馏水洗涤;

[0046] (11) 加入免疫荧光直标荧光一抗孵育,37℃反应60min,避光;

[0047] (12) PBS洗细胞爬片3分钟×3次;

[0048] (13) 利用含DAPI染色剂将细胞爬片封片,在荧光显微镜下观察拍照,即得。

[0049] 实施例3

[0050] 采用实施例1的试剂盒以及实施例2的检测方法,通过蛋白质免疫荧光和RNA FISH共染在同一细胞水平检测Y蛋白(UniProtKB-P46937)与lncRNA G (NCBI Reference Sequence:NR_002578.3)的表达。

[0051] 首先,固定结肠癌细胞系HCT116,暴露mRNA核酸片段。

[0052] 其次,进行预杂交后再进行杂交过夜。

[0053] 再次,封闭滴加生物素化鼠抗地高辛,PBS洗3遍后滴加荧光二抗:取1u1 SABC-FITC加原位杂交用PBS稀释为100u1,37℃孵育30分钟。

[0054] 最后,孵育免疫荧光直标Alexa**Fluor**®647荧光一抗,37℃孵育60min。(避光)PBS洗3遍后,利用含DAPI染色剂封片,然后在荧光显微镜下观察拍照。

[0055] 结果如图1所示,其中,lncRNA G的染色是通过抗地高辛抗体标记SABC-FITC来实现,在荧光显微镜下呈现绿色;Y蛋白的染色是通过直标Alexa**Fluor**®647荧光的Anti-Y抗体来实现,在荧光显微镜下呈现红色;细胞核被DAPI染色,在激光下呈现蓝色;当三色荧光融合后,可见,lncRNA G与Y蛋白的定位一致性很高,红色与绿色荧光重叠,呈现为黄色。

[0056] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

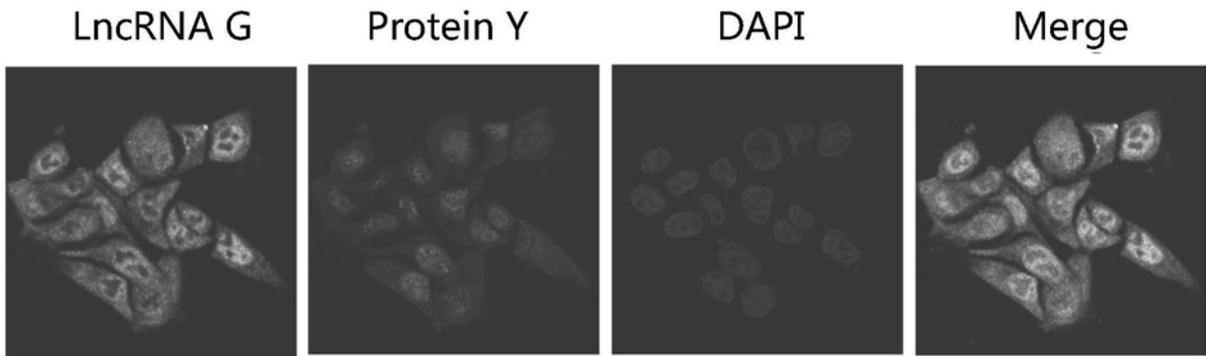


图1

专利名称(译)	一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒和方法		
公开(公告)号	CN111363789A	公开(公告)日	2020-07-03
申请号	CN201811596144.2	申请日	2018-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
[标]发明人	李建明 倪雯 周云侠		
发明人	李建明 倪雯 姚溯 周云侠		
IPC分类号	C12Q1/6841 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	颜希文		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测蛋白质和RNA的试剂盒，所述试剂盒包括固定液、胃蛋白酶、杂交液、封闭液、生物素化地高辛、荧光一抗、荧光二抗和DAPI复染封片剂；本发明还公开了一种同时检测蛋白质和RNA的方法。采用本发明的检测试剂盒和方法，能在同一组织或细胞水平同时检测蛋白质与RNA的共定位表达，通过荧光显微镜可直观的观察蛋白质与RNA的表达情况。

