



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103087146 A

(43) 申请公布日 2013.05.08

(21) 申请号 201110345434.1

(22) 申请日 2011.11.04

(71) 申请人 新疆维吾尔自治区畜牧科学院中
国 - 澳大利亚绵羊育种研究中心
地址 830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市
沙依巴克区克拉玛依东街 151 号

(72) 发明人 张雪梅 李文蓉 贺三刚 张宁
刘明军

(74) 专利代理机构 乌鲁木齐新科联专利代理事
务所(有限公司) 65107
代理人 欧咏

(51) Int. Cl.

C07K 1/14 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54) 发明名称

一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法

(57) 摘要

本发明提供一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法,针对绵羊皮肤组织结构的复杂性,采用冷冻破碎法粉碎组织,然后摸索出适合绵羊皮肤组织的超声破碎条件,并通过涡旋使样品裂解更充分,以便能提高皮肤组织的利用率,尽可能少地破坏蛋白内的分子结构,产出高质量的蛋白。该方法操作简单可靠,方便快捷,成本低廉,为体内皮肤组织蛋白提取提供了成熟的高效的技术方法。

1. 一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法,其特征在于:分前处理、冷冻破碎、冰浴超声、蛋白定量及 SDS-PAGE、Western-blot 的检测步骤:

步骤 1. 将冰浴皮肤组织样品拔毛处理,用预冷的 1×PBS 洗涤 3 次,吸干液体;称取 25-30mg 样品,置于预冷的 2ml 离心管中,将其剪碎至 0.8-1mm³ 的小块,置于 -70℃ 冰箱中;

步骤 2. 取上步样品,加入直径为 5-7cm 无菌钢珠,置于 TissueLyser LT 仪器中粉碎,其频率 50Hz,工作 2-5min;破碎后,取出钢珠,加入预冷的蛋白酶抑制剂的裂解液,其加量为每 100mg 湿重组织加 200-300μl,置于冰浴中超声破碎,其功率 200W,工作 10S,间隙 15S,25 次,且避免大量泡沫产生;

步骤 3. 将超声后的样品置于漩涡混合器上涡旋 30-40S,4℃、采用 13000 转 / 分钟、离心 25-30 分钟;提取上清液,置于 -70℃ 冰箱中,用 BCA 法测定其蛋白浓度;取 100μg 蛋白样品加入等量的 2×loading buffer 混合均匀,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白;

步骤 4. 采用 Western blotting 免疫印迹检测蛋白的表达,即操作:将凝胶放入电转缓冲液中,湿转法 100V 转印 60 min 后,加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,用一抗鼠抗 HA 单抗 1 : 400 稀释,同时以 β-actin 抗体 1:400 稀释作内参,4℃ 过夜孵育,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,用二抗为 IRDye® 800CW 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 1 : 12 000 稀释,室温孵育 50 min,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,再用 PBS 洗涤一次,用 Li-Cor Biosciences 扫描成像;

上述裂解液配方:9M 尿素 2.7 克,4 % CHAPS 0.2g,用高压灭菌去离子水溶解,补至 5ml,冻存于 -20℃ 冰箱中,使用前加入 4 % 蛋白酶抑制剂;

上述添加蛋白酶抑制剂的裂解液,其蛋白酶抑制剂与裂解液体积比为 4% ;

上述的 TissueLyser LT 仪器在使用前,置于 -70℃ 冰箱中进行预冷处置。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:所述的 BCA 法测定,即采用酶标仪检测 562 nm 波长下的光密度值,制定标准曲线,计算其蛋白浓度。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:选用小鼠单克隆抗体 HA 购自北京天根生化科技有限公司;选用的 4 % 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;选用的 TissueLyser LT 仪器由德国 QIAGEN 公司生产;选用的 4 % CHAPS(3-[(3- 胆固醇氨丙基) 二甲基氨基]-1- 丙磺酸)由 Sigma 公司生产;选用的鼠抗 β-actin 单克隆抗体由博士德公司生产;选用的羊抗属 IRDye® 800CW 抗体由 ODYSSEY 公司生产。

一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及绵羊皮肤组织蛋白提取的方法,可用于蛋白的 Western blot 杂交检测,也可用于二维凝胶电泳(2-DE)分离,以及利用皮肤组织制备生物活性的蛋白质。

背景技术

[0002] 绵羊皮肤组织致密,结构完善,有着重要的保护作用。绵羊皮肤由表皮和真皮组成,表皮有许多衍生物,如各种腺体、毛、角、爪、甲、蹄;真皮发达,由胶原纤维及弹性纤维的结缔组织构成,两种纤维交错排列,其间分布有各种结缔组织细胞、感受器官、运动神经末梢及血管、淋巴等;相对于其它组织来说,绵羊皮肤组织结构更为复杂,皮肤组织蛋白的提取也较其它组织难度大;获得一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法对于研究绵羊组织器官功能、生物活性蛋白制备具有重要意义。

[0003] 据文献检索披露:① 2010 年徐小燕、夏蒲,邢亚楠等在《中国医科大学学报》2010, 39(5):336-339. 发表的文章“冻结破碎法提取组织蛋白方法初探”揭示了冻结破碎法和匀浆法提取小鼠组织蛋白后进行蛋白定量,然后用 Western blot 检测内参 β -actin 蛋白的表达,结果表明两种方法提取的总蛋白浓度以及 β -actin 蛋白表达无明显统计学差异。② 2009 年王筋、裴国献等在《生命科学研究》2009, 13(2):137-141)发表的“兔骨组织总蛋白的提取和在免疫印迹法中的应用”采用单纯研磨法、单纯锤击法和锤击研磨法分别对兔骨组织蛋白进行提取,通过 SDS-PAGE 和免疫印迹法检测骨组织中 β -actin 的表达,比较 3 种骨组织蛋白提取法,结果表明锤击研磨法更为方便、快捷,可作为提取骨组织蛋白的一种理想方法。③ 2007 年王桂叶等在《郑州大学学报(医学版)》. 2007, 42(4):660-662. 上发明的“3 种方法提取胸腺组织蛋白双向电泳纯化结果比较”分别采用组织裂解液法、丙酮沉淀法和蛋白纯化试剂 3 种方法提取 7 例重症肌无力患者胸腺组织蛋白质,用 SDS-PAGE 和二维电泳检测蛋白。结果表明:采用蛋白纯化试剂法提取胸腺组织蛋白,能够获得较好 2-DE 凝胶图像。检索未见有理想的提取皮肤组织蛋白的方法报道。

[0004] 本发明构思是将冷冻破碎与冰浴超声相结合,针对绵羊皮肤组织的特点,在进行皮肤的研磨和蛋白质溶解时,先尽量拔除绵羊皮肤表皮密布的毛发(毛发含有大量的角蛋白),使角蛋白及非皮肤组织的蛋白质的含量大大降低,从而增加了表皮及真皮组织的蛋白质在溶解液中的相对浓度,有效富集了皮肤组织蛋白,为研究皮肤中蛋白质表达谱和制备皮肤组织的活性蛋白奠定了基础。

发明内容

[0005] 本发明目的在于:提供高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法,为制备绵羊皮肤组织蛋白和进一步研究绵羊皮肤组织蛋白的功能奠定基础。

[0006] 本发明是这样实现的:一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法,分前处理、冷冻破碎、冰浴超声、蛋白定量及 SDS-PAGE、Western-blot 的检测步骤:

步骤 1. 将冰浴皮肤组织样品拔毛处理,用预冷的 $1 \times$ PBS 洗涤 3 次,吸干液体;称取

25-30mg 样品,置于预冷的 2ml 离心管中,将其剪碎至 $0.8-1\text{mm}^3$ 的小块,置于 -70°C 冰箱中;

步骤 2. 取上步样品,加入直径为 5-7cm 无菌钢珠,置于 TissueLyser LT 仪器中粉碎,其频率 50Hz,工作 2-5min;破碎后,取出钢珠,加入预冷的蛋白酶抑制剂的裂解液,其加量为每 100mg 湿重组织加 200-300 μl ,置于冰浴中超声破碎,其功率 200W,工作 10S,间隙 15S,25 次,且避免大量泡沫产生;

步骤 3. 将超声后的样品置于漩涡混合器上涡旋 30-40S, 4°C 、采用 13000 转 / 分钟、离心 25-30 分钟;提取上清液,置于 -70°C 冰箱中,用 BCA 法测定其蛋白浓度;取 100 μg 蛋白样品加入等量的 $2\times$ loading buffer 混合均匀,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白;

步骤 4. 采用 Western blotting 免疫印迹检测蛋白的表达,即操作:将凝胶放入电转缓冲液中,湿转法 100V 转印 60 min 后,加入 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,用一抗鼠抗 HA 单抗 1 : 400 稀释,同时以 β -actin 抗体 1:400 稀释作内参, 4°C 过夜孵育,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,用二抗为 IRDye[®] 800CW 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 1 : 12 000 稀释,室温孵育 50 min,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,再用 PBS 洗涤一次,用 Li-Cor Biosciences 扫描成像;

上述裂解液配方:9M 尿素 2.7 克,4 % CHAPS 0.2g,用高压灭菌去离子水溶解,补至 5ml,冻存于 -20°C 冰箱中,使用前加入 4 % 蛋白酶抑制剂;

上述添加蛋白酶抑制剂的裂解液,其蛋白酶抑制剂与裂解液体积比为 4 %;

上述的 TissueLyser LT 仪器在使用前,置于 -70°C 冰箱中进行预冷处置。

[0007] 所述的方法,所述的 BCA 法测定,即采用酶标仪检测 562 nm 波长下的光密度值,制定标准曲线,计算其蛋白浓度。

[0008] 本发明的研究作用机理:将冷冻破碎与冰浴超声相结合处理绵羊皮肤组织,提取总蛋白后进行蛋白定量,并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对提取的蛋白进行分离,利用 Western blot 检测绵羊皮肤组织中 FGF5s 基因和内参基因 β -actin 蛋白的表达,进而在蛋白质水平上进行相关功能的研究。

[0009] 本发明的技术特点:(1) 由于绵羊皮肤有大量衍生物和各种结缔组织,用冷冻破碎法可使样品粉碎彻底及快速,大大降低使用液氮的成本。(2) 为使裂解液彻底裂解组织,进行超声破碎;超声破碎可控制强度,低于溶液产生泡沫的水平,注意散热,防止蛋白质变性,获取高质量的蛋白。(3) 配制的裂解液选用 CHAPS 是一种两性离子去垢剂、蛋白质裂解液,用于增溶膜蛋白和裂解蛋白-蛋白之间的相互作用;高浓度的尿素可以造成强变性条件;为防止蛋白降解,加入了 Roche 公司生产的 cocktail 蛋白酶抑制剂。该方法操作简单可靠,方便快捷,获取的大量蛋白质,为体内皮肤组织蛋白的研究奠定基础,彰显技术进步。

附图说明

[0010] 本发明对照附图作进一步说明。

[0011] 附图 1 为采用 BCA 法对蛋白进行定量的标准曲线;

如图所示:得到的标准曲线方程为 $y=0.000944x+0.454$ 。

[0012] 附图 2 为转基因绵羊的 FGF5s 基因表达的 Western Blot 检测结果;

如图所示:00813 为非转基因绵羊皮肤组织蛋白样品对照;114,112,121,117,115,142,128,148 为转基因绵羊皮肤组织蛋白样品。

[0013]

具体实施方式

[0014] 本发明对照实施例作进一步说明。

[0015] 实验操作：

对皮肤组织采用前处理、冷冻破碎、冰浴超声、蛋白定量、SDS-PAGE、Western-blot 检测的步骤：。

[0016] 1) 用镊子将采集的皮肤组织在冰浴中拔除表面毛发,用预冷的 1×PBS 磷酸缓冲液洗涤 3 次,用灭菌滤纸吸干皮肤组织块表面溶液,称取 30mg 皮肤组织样品置于提前预冷的 2ml 离心管中,用已高压灭菌的剪刀将样品剪碎至 1mm³ 块,置于 -70℃ 冰箱；

2) 取出冻存的皮肤组织样品,加入直径为 7cm 的无菌钢珠,置于 QIAGEN 公司的 TissueLyser LT 仪器中 50HZ 工作 3min (仪器在使用前置于 -70 冰箱预冷),直至冷冻的皮肤组织样品彻底粉碎；

3) 破碎结束后,取出钢珠,加入预冷的含 cocktail (Roche 公司生产,临用前按 4% 体积比加入)抑制剂的蛋白裂解液(每 100mg 湿重组织加入 300μl 裂解液),将样品置于冰浴中超声破碎;其超声条件为功率 200W,工作 10S,间隙 15S,25 次;超声过程中一定要确保样品在冰浴条件下且尽量避免产生大量泡沫,若产生泡沫可将样品静置于冰盒中几分钟或瞬时离心样品;上述裂解液配方:9M 尿素 2.7 克,4% (W/V)CHAPS 0.2 克,加灭菌去离子水溶解,加至 5ml 即可,临用前加入 4% (V/V) cocktail;裂解液配好后,按照 500 微升 / 管分装,冻存于 -20℃ 冰箱,勿反复冻融；

4) 超声结束后于漩涡混合器上涡旋 30S,4℃、13000 转 / 分钟、离心 30 分钟；

5) 吸取上清即为含有总蛋白的提取液,将样品分装保存于 -70℃ 冰箱；

6) 用 BCA 法测定提取液中的蛋白浓度,以牛血清白蛋白标准溶液(2 mg/ml) 作为对照,采用酶标仪检测 562 nm 波长下的光密度值,制定标准曲线,根据得出的标准曲线方程: $y=0.000944x+0.454$ 计算出样品的蛋白浓度；

7) 在定量好的蛋白样品中加入等量 2×loading buffer 混匀,按常规方法进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分离蛋白；

8)Western blotting 免疫印迹检测蛋白的表达,具体操作:将凝胶放入电转缓冲液中,湿转法 100V 转印 60 min 后,加 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,用一抗为鼠抗 HA 单抗 1 : 400 稀释,同时用 β-actin 抗体 1:400 稀释做内参,4℃ 过夜孵育,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,用二抗为 IRDye® 800CW 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 1 : 12 000 稀释,室温孵育 50 min,用 PBST 洗涤 5 次,每次 10 min,最后用 PBS 洗涤一次,Odyssey 近红外双色激光成像系统 (Li-Cor Biosciences) 扫描成像。

[0017] 所述的方法,选用小鼠单克隆抗体 HA 购自北京天根生化科技有限公司;选用的 4% 蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;选用的 TissueLyser LT 仪器由德国 QIAGEN 公司生产;选用的 4% CHAPS (3-[3-(胆固醇氨基丙基) 二甲基氨基]-1-丙磺酸) 由 Sigma 公司生产;选用的鼠抗 β-actin 单克隆抗体由博士德公司生产;选用的羊抗属 IRDye® 800CW 抗体由 ODYSSEY 公司生产。

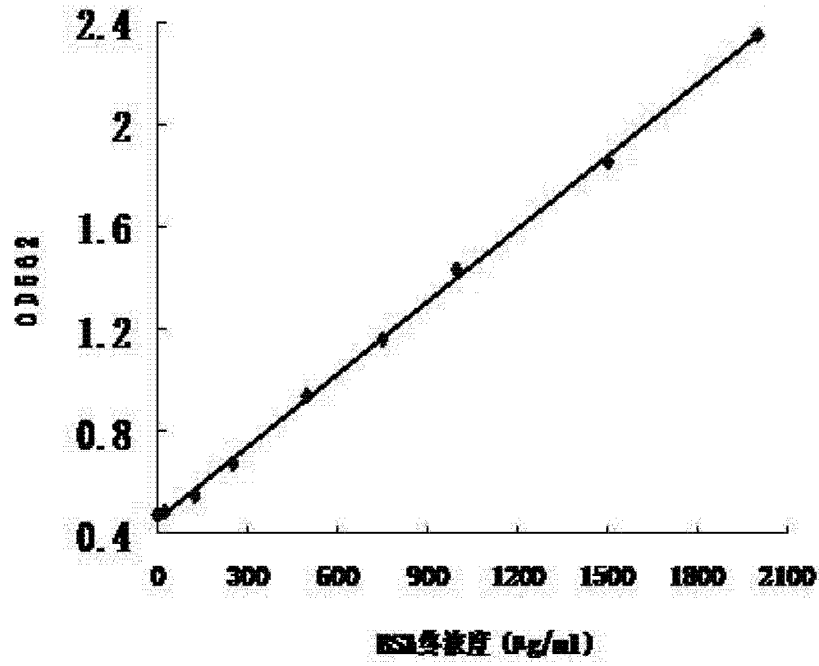


图 1

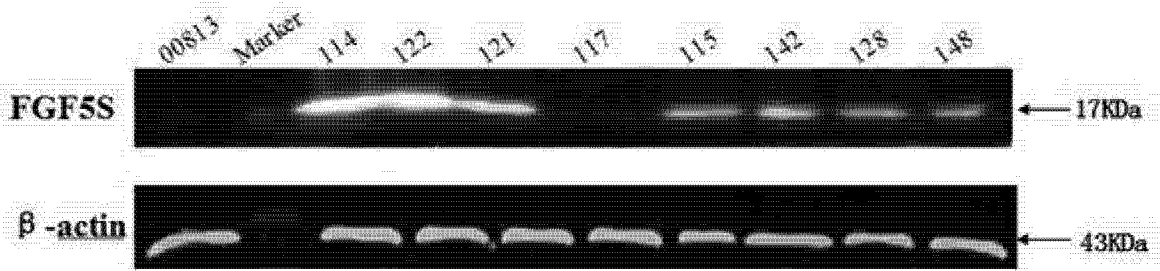


图 2

专利名称(译)	一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法		
公开(公告)号	CN103087146A	公开(公告)日	2013-05-08
申请号	CN201110345434.1	申请日	2011-11-04
[标]申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院中国-澳大利亚绵羊育种研究中心		
申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院中国-澳大利亚绵羊育种研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	新疆维吾尔自治区畜牧科学院中国-澳大利亚绵羊育种研究中心		
[标]发明人	张雪梅 李文蓉 贺三刚 张宁 刘明军		
发明人	张雪梅 李文蓉 贺三刚 张宁 刘明军		
IPC分类号	C07K1/14 G01N33/53		
其他公开文献	CN103087146B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种高效提取绵羊皮肤组织蛋白的方法，针对绵羊皮肤组织结构的复杂性，采用冷冻破碎法粉碎组织，然后摸索出适合绵羊皮肤组织的超声破碎条件，并通过涡旋使样品裂解更充分，以便能提高皮肤组织的利用率，尽可能少地破坏蛋白内的分子结构，产出高质量的蛋白。该方法操作简单可靠，方便快捷，成本低廉，为体内皮肤组织蛋白提取提供了成熟的高效的技术方法。

