



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110488000 B

(45) 授权公告日 2021. 02. 23

(21) 申请号 201910804197.7

(22) 申请日 2019.08.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110488000 A

(43) 申请公布日 2019.11.22

(73) 专利权人 武汉金开瑞生物工程有限公司
地址 430000 湖北省武汉市东湖开发区高新大道666号武汉国家生物产业基地项目B、C、D区研发楼B1楼

(72) 发明人 徐世华 华权高 李立 吴笛笛
舒芹

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所
(特殊普通合伙) 42242
代理人 严超

(51) Int.Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108251379 A, 2018.07.06

CN 101463071 A, 2009.06.24

CN 104628810 A, 2015.05.20

CN 109897086 A, 2019.06.18

CN 108383901 A, 2018.08.10

江晓丰等. γ δ T细胞识别别人多发性骨髓瘤细胞XG-7膜热休克蛋白-70.《中国免疫学杂志》. 1999, 第15卷 (第4期),

审查员 舒霏霏

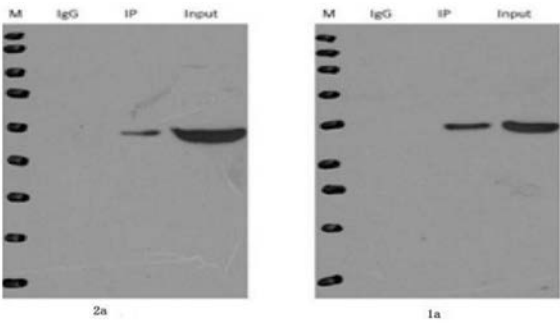
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于抽提膜蛋白的裂解液

(57) 摘要

本发明提供一种用于抽提膜蛋白的裂解液, 包括: 去垢剂、缓冲剂、蛋白酶抑制剂及氯化钠溶液; 其中, 所述去垢剂包括聚乙二醇辛基苯基醚或3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐中的一种或两种; 所述缓冲剂包括三(羟甲基)氨基甲烷或3-环己胺基-2-羟基丙磺酸中的一种或两种; 所述去垢剂占所述用于抽提膜蛋白的裂解液的质量比为0.2%~2%。本发明的有益效果在于: 本发明裂解液在提高膜蛋白提取率的同时又能保证后续抗原抗体免疫复合物生成率, 提高后续检测的成功率。



1. 一种用于抽提膜蛋白的裂解液,其特征在于,所述用于抽提膜蛋白的裂解液包括:
50 mmol/L 的pH为8.0的Tris-HCl,100 mmol/L NaCl,2 mmol/L EDTA,质量百分比为10% 甘油,质量百分比为0.4% Triton X-100,质量百分比为0.4% CAPSO,质量百分比为0.4% CHAPS,5 mmol/L DTT、蛋白酶抑制剂混合物1x PIC及1 mmol/L PMSF。

一种用于抽提膜蛋白的裂解液

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种用于抽提膜蛋白的裂解液。

背景技术

[0002] 免疫共沉淀是一项生命科学研究中常用的蛋白质相互作用研究实验方法,由于蛋白质相互作用是细胞内以及细胞间分子功能、代谢过程的主要形式之一,能够解答大量生物学基础科学问题,因此免疫共沉淀实验是现今细胞生物学、生物化学、分子生物学研究领域常用技术。膜蛋白在许多生命过程的分子机制中起着关键作用,如细胞的能量代谢、分化增殖、物质运输、信号转导等。同时膜蛋白也是药物研究中的热门靶点,据统计有60%的药物以膜蛋白为作用靶点。因此,应用于膜蛋白的免疫共沉淀技术具有非常重要的科研以及应用价值。

[0003] 在蛋白抽提环节中,为了促进蛋白溶解,通常会在裂解液中加入去垢剂,现今常用的去垢剂包括温和型去垢剂聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、乙基苯基聚乙二醇(NP-40)及强离子型去垢剂十二烷基硫酸钠(SDS)等等,选用不同类型不同浓度的去垢剂对膜蛋白的提取及后续的免疫共沉淀实验都会造成很大的影响。

[0004] 目前采用的裂解液配方中,以温和型去垢剂为主的配方往往会出现膜蛋白溶解率不高;采用强离子型去垢剂如SDS与脱氧胆酸钠进行配合使用会增加膜蛋白的溶解率,但会导致抗原抗体免疫复合物形成受到抑制;这些原因都不能有效将膜蛋白及其相互作用蛋白进行沉淀并收集,导致后续检测成功率降低,因此,选用研究合适裂解液配方兼顾膜蛋白的溶解率及后续蛋白沉淀物的生成很有必要。

发明内容

[0005] 为解决现有裂解液在膜蛋白免疫共沉淀测试中,提取后的膜蛋白与抗体反应生成抗原抗体免疫复合物生成率低的技术问题,本发明提供一种抽提膜蛋白的裂解液。

[0006] 具体技术方案如下:

[0007] 一种用于抽提膜蛋白的裂解液,其不同之处在于,所述用于抽提膜蛋白的裂解液包括:

[0008] 去垢剂、缓冲剂、蛋白酶抑制剂及氯化钠溶液;

[0009] 其中,所述去垢剂包括聚乙二醇辛基苯基醚或3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐中的一种或两种;

[0010] 所述缓冲剂包括三(羟甲基)氨基甲烷或3-环己胺基-2-羟基丙磺酸中的一种或两种;

[0011] 所述去垢剂占所述抽提膜蛋白的裂解液的质量比为0.2%~2%。

[0012] 上述技术方案中,所述用于抽提膜蛋白的裂解液还包括质量比为3%~15%的甘油。

[0013] 上述技术方案中,所述用于抽提膜蛋白的裂解液还包括还原剂。

- [0014] 上述技术方案中,所述氯化钠溶液的浓度为80mmol/L~180mmol/L。
- [0015] 上述技术方案中,所述三(羟甲基)氨基甲烷的pH值为7~8,浓度为15mmol/L~60mmol/L。
- [0016] 上述技术方案中,所述缓冲剂包括3-环己胺基-2-羟基丙磺酸,所述3-环己胺基-2-羟基丙磺酸的占所述用于抽提膜蛋白的裂解液的质量比为0.3%~0.6%。
- [0017] 上述技术方案中,所述蛋白酶抑制剂包括乙二胺四乙酸或苯甲基磺酰氟中的一种或两种;
- [0018] 其中,所述乙二胺四乙酸的浓度为0.8mmol/L~2.5mmol/L;所述苯甲基磺酰氟的浓度为0.8mmol/L~1.2mmol/L。
- [0019] 上述技术方案中,所述去垢剂包括聚乙二醇辛基苯基醚,所述聚乙二醇辛基苯基醚占所述用于抽提膜蛋白的裂解液的质量百分比为0.2%~1.5%。
- [0020] 上述技术方案中,所述3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐占所述用于抽提膜蛋白的裂解液的质量百分比为0.3%~1.2%。
- [0021] 上述技术方案中,所述还原剂包括二硫苏糖醇,所述二硫苏糖醇的浓度为4mmol/L~6mmol/L。
- [0022] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:本发明裂解液在提高膜蛋白提取率的同时又能保证后续抗原抗体免疫复合物生成率,提高后续检测的成功率。

附图说明

- [0023] 图1为实施例五实验1.1蛋白抽提后PAGE检测效果图;
- [0024] 图2为实施例五实验1.2蛋白抽提后PAGE检测效果图;
- [0025] 图3为实施例六免疫共沉淀产物WesternBlot检测结果。

具体实施方式

- [0026] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。
- [0027] 本发明成分“去垢剂”可将疏水蛋白从其膜结构中溶解下来,3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)为一种两性表面活性剂,也是一种非变性的zwitterionic去垢剂,可有效增加膜蛋白的溶解,用于蛋白质裂解液中以研究蛋白和蛋白之间的相互作用;
- [0028] 本发明成分“缓冲剂”可以防止pH的大幅度变化,而且可以将离子强度保持在生理范围内,并防止蛋白质与其他离子结合形成不溶性产物,3-环己胺基-2-羟基丙磺酸(CAPS0)是一种生物缓冲剂,可用于免疫印迹和免疫沉淀实验;
- [0029] 本发明成分“蛋白酶抑制剂”可抑制因“去垢剂”破坏膜结构释放出的大量蛋白酶的作用,从而保护膜蛋白;
- [0030] 本发明成分“氯化钠溶液”可保证整个膜蛋白提取过程中接近于生理盐水的浓度;
- [0031] 本发明成分“还原剂”可以防止蛋白-SH被氧化而失活;
- [0032] 本发明成分“甘油”由于其粘性,可以对蛋白质起到一个很好的保护作用。
- [0033] 实施例各成分中文与英文简称对比:
- [0034] 聚乙二醇辛基苯基醚:Triton X-100;3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐:

CHAPS;十二烷基硫酸钠:SDS;三(羟甲基)氨基甲烷:Tris-HCl;3-环己胺基-2-羟基丙磺酸:CAPSO;乙二胺四乙酸:EDTA;苯甲基磺酰氟:PMSF;二硫苏糖醇:DTT;G型链球菌分离而得的细胞壁蛋白:Protein G;磷酸缓冲盐溶液:PBS。

[0035] 实施例一

[0036] 按下列浓度或质量百分比配置裂解液:

[0037] 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.4% Triton X-100, 0.4% CAPSO, 0.4% CHAPS, 5mmol/L DTT, 1x PIC (碧云天蛋白酶抑制剂混合物)、1mmol/L PMSF。

[0038] 实施例二

[0039] 按下列浓度或质量百分比配置裂解液:

[0040] 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.4% Triton X-100, 0.4% CHAPS, 5mmol/L DTT, 1x PIC (碧云天蛋白酶抑制剂混合物)、1mmol/L PMSF。

[0041] 实施例三

[0042] 按下列浓度或质量百分比配置裂解液:

[0043] 50mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 10% 甘油, 1% Triton X-100, 0.5% CAPSO, 5mmol/L DTT, 1x PIC (碧云天蛋白酶抑制剂混合物)、1mmol/L PMSF。

[0044] 实施例四

[0045] 按下列浓度或质量百分比配置裂解液:

[0046] 50mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 150mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA, 10% 甘油, 1% CHAPS, 5mmol/L DTT, 1x PIC (碧云天蛋白酶抑制剂混合物)、1mmol/L PMSF。

[0047] 对比例一

[0048] 按下列浓度或质量百分比配置裂解液:

[0049] 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA, 10% 甘油, 0.8% SDS, 0.4% CAPSO, 5mmol/L DTT, 1x PIC (碧云天蛋白酶抑制剂混合物)、1mmol/L PMSF。

[0050] 实施例五

[0051] 膜蛋白抽提效果验证:

[0052] 1.1

[0053] 收集三种不同细胞样品后, 每种细胞样品均分为三份, 一组为实验一组依次标号为1a、1b、1c;

[0054] 一组为对照组, 对应依次标号为2a、2b、2c;

[0055] 一组为实验二组, 对应依次标号为3a、3b、3c;

[0056] 实验一组加入实施例一裂解液, 混匀, 再将冰盒放在摇床上摇动30min, 使样品充分裂解, 超声破碎30s (超声2s, 间歇3s为一个循环, 共6个循环), 然后12000rpm 4℃离心20min, 吸取上清作为抽提产物;

[0057] 对照一组加入对比例一裂解液, 混匀, 再将冰盒放在摇床上摇动30min, 使样品充分裂解, 超声破碎30s (超声2s, 间歇3s为一个循环, 共6个循环), 然后12000rpm 4℃离心20min, 吸取上清作为抽提产物;

[0058] 实验二组加入实施例二裂解液,混匀,再将冰盒放在摇床上摇动30min,使样品充分裂解,超声破碎30s(超声2s,间歇3s为一个循环,共6个循环),然后12000rpm 4℃离心20min,吸取上清作为抽提产物;

[0059] 将实验一组、对比一组、实验二组的抽提物稀释10倍后,分别用紫外分光光度计进行浓度检测,测试结果如表1所示;

[0060] 将实验一组、对比一组的抽提物分别用PAGE检测抽提效率,测试结果如图1所示,结果显示在未加入SDS进行抽提的情况下,其膜蛋白抽提效率依旧很高。

[0061] 表1实验一组、实验二组及对照组抽提物浓度测试结果

[0062]	样品编号	OD 值	蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
	1a	0.6424	6.1
	1b	0.8149	8.2
	1c	0.9464	9.8
	2a	0.5848	5.4
	2b	0.7425	7.1
	2c	0.4945	4.3
	3a	0.3861	3.0
	3b	0.4784	4.1
	3c	0.3516	2.6

[0063] 1.2

[0064] 收集三种不同的细胞样品后依次标记为A、B、C,每份细胞均分为三份,依次标号为依次标号为1-A、2-A、3-A,1-B、2-B、3-B,1-C、2-C、3-C,其中,1-A、1-B、1-C样品加入实施例一裂解液,2-A、2-B、2-C样品加入对比例一裂解液,3-A、3-B、3-C样品加入市面上广泛使用的某品牌IP弱裂解液进行抽提;

[0065] 混匀,再将冰盒放在摇床上摇动30min,使样品充分裂解,超声破碎30s(超声2s,间歇3s为一个循环,共6个循环),然后12000rpm4℃离心20min,吸取上清作为抽提产物;

[0066] 抽提物稀释10倍后分别用紫外分光光度计进行浓度检测,测试结果如表2所示;

[0067] 抽提物分别用PAGE检测抽提效率,测试结果如图2所示,本发明抽提液与加入SDS的抽提液及市面上广泛使用的某品牌裂解液相比,具有良好的抽提效果。

[0068] 表1抽提物浓度测试结果

[0069]	样品编号	OD 值	蛋白浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
	1-A	0.7926	10.1
	1-B	1.2884	16.6
	1-C	0.7959	10.2
	2-A	0.6061	7.7
	2-B	0.6596	8.4
	2-C	0.6055	7.7
	3-A	0.3904	4.9
	2-B	0.5357	6.8
	3-C	0.4366	5.5

[0070] 实施例六

[0071] 免疫共沉淀实验

[0072] 选择实施例五中1a及2a提取物作为免疫共沉淀实验：

[0073] 2.1

[0074] 蛋白抽提产物预处理：准备Protein G琼脂凝胶珠，用PBS洗珠子两遍，然后用PBS制成50%浓度，剪去枪头避免在涉及琼脂糖的操作中破坏琼脂凝胶珠；在每1mL实施例五抽提产物中（约含2mg细胞总蛋白），加入100 μL Protein G琼脂凝胶珠（50%），1 μL 非免疫血清，4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上摇晃2h后，4000r/min离心去除珠子，收集上清，以去除非特异性杂蛋白，降低背景；

[0075] 抗原抗体免疫复合物形成及沉淀收集：从处理好的全细胞裂解液中取出2mg，加入抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育过夜；加入100 μL Protein G琼脂糖珠，4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动与抗原抗体混合物孵育5h；4000rpm离心3min，收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物，用预冷PBS洗3遍，第三次后重复离心，确保洗液完全去除；PBST洗珠子4次5min/次；用40 μL 2 $\times$ 上样缓冲液将琼脂糖珠-抗原抗体复合物悬起，大孔Tip头混匀。

[0076] 2.2

[0077] 将上述样品95 $^{\circ}\text{C}$ 煮5min，免疫共沉淀产物Western Blot检测结果，测试结果如图3，使用本发明裂解液后续免疫共沉淀效率高。

[0078] 本发明选用去垢剂是膜蛋白溶解的关键成分，辅之三（羟甲基）氨基甲烷或3-环己胺基-2-羟基丙磺酸作为缓冲剂可兼顾后续的免疫共沉淀过程中抗原抗体免疫复合物形成

效率,加之其余成分的相互配合,提高实验成功率。

[0079] 本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

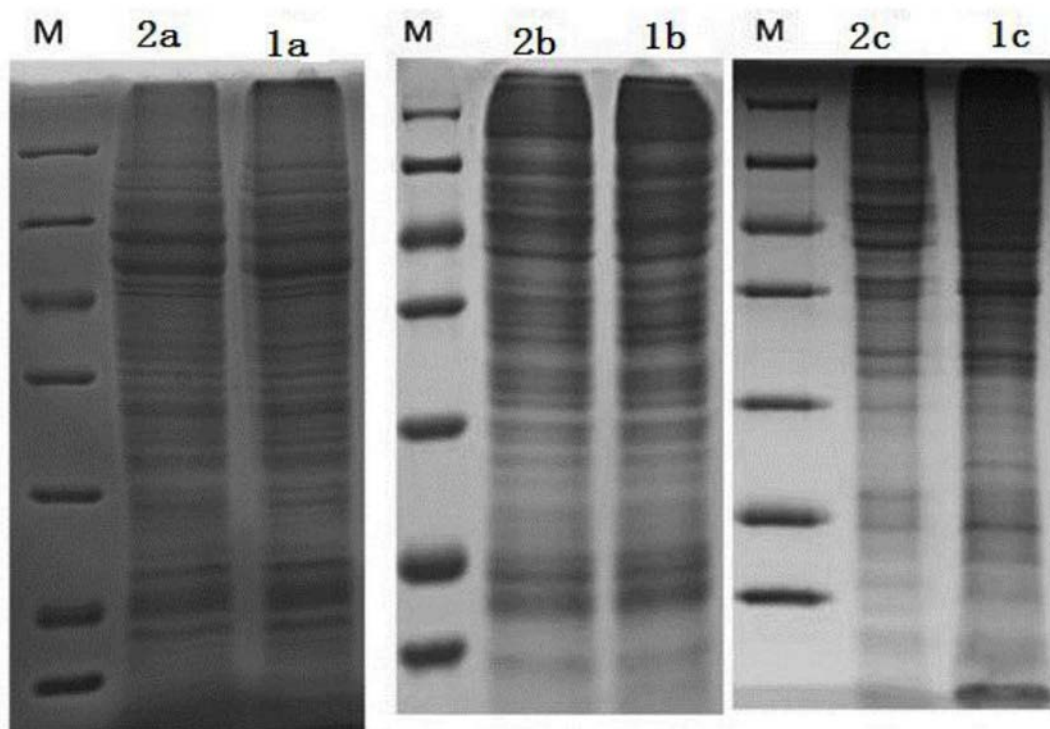


图1

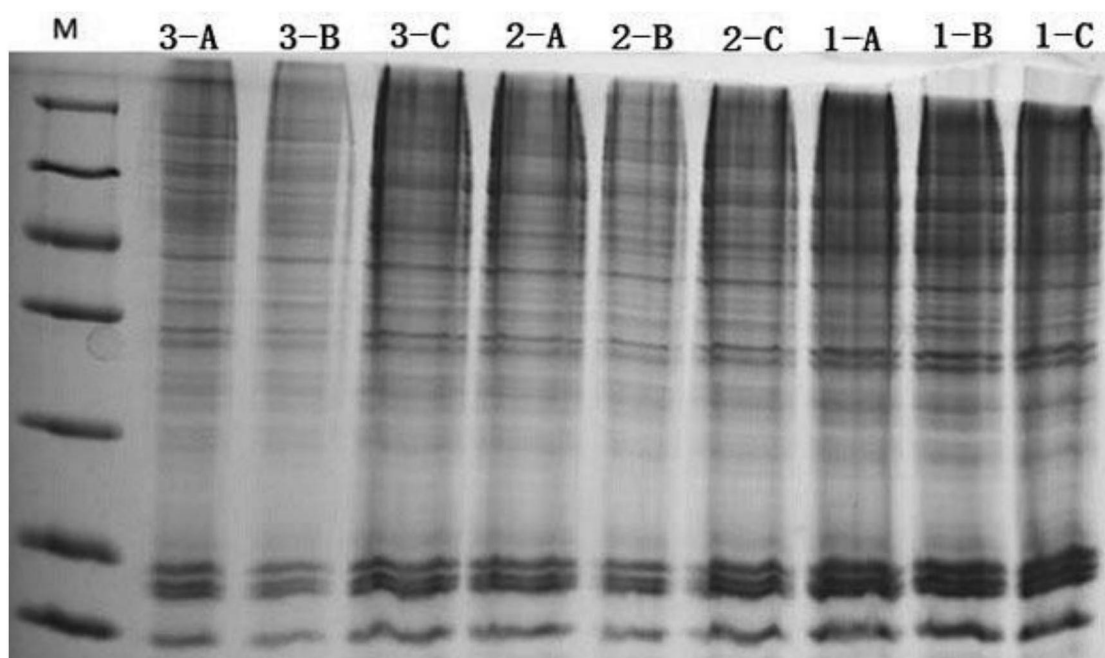


图2

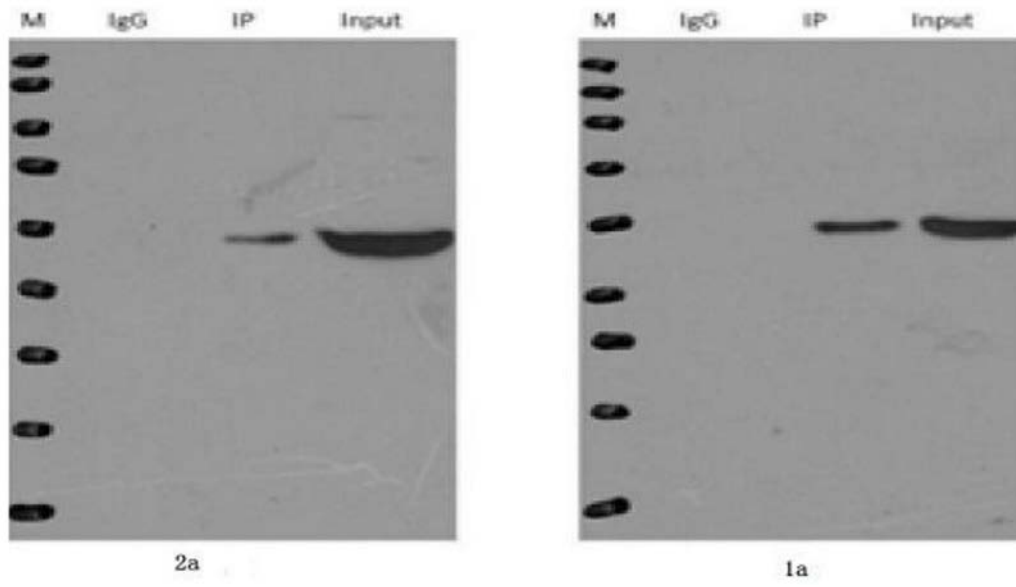


图3