(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103242547 A
(43)申请公布日 2013.08.14

(21)申请号 201310036047.9

(22)申请日 2013.01.20

(71)申请人 温州医学院
地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区温州医学院

(72)发明人 李湘麒 谭毅 张弛 梁广

(51)Int.Cl.
C08J 7/00(2006.01)
C08J 3/24(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/545(2006.01)
G01N 33/548(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种膜用生物高分子交联剂及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及一种膜用生物高分子交联剂及其制备方法与应用，属于生物技术领域。该膜用生物高分子交联剂包括如下按质量百分比计的组分多聚赖氨酸0.001～0.025%，精氨酸0.05～0.2%，色氨酸0.01～1%，酪氨酸0.01～1%，Triton-X-100 0.0002～0.005% (V/V)，余量为pH＝8~10的水。将上述制备百分比的组分混匀得到膜用生物高分子交联剂。本发明提供的膜用生物高分子交联剂能使核酸和蛋白直接交联到核酸／蛋白转印膜上，省去了固定核酸或蛋白对仪器的依赖，提高了核酸／蛋白的检测灵敏度。

CN 103242547 A

1. 一种膜用生物高分子交联剂，其特征在于所述的膜用生物高分子交联剂包括如下按质量百分比计的组分：

多聚赖氨酸	0.001～0.025%
精氨酸	0.05～0.2%
色氨酸	0.01～1%
酪氨酸	0.01～1%
聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-X-100）	0.0002～0.005%（V/V）

余量为碱性水 (PH = 8-10)。

2. 根据权利要求 1 所述的膜用生物高分子交联剂，其特征在于所述的膜用生物高分子交联剂优选配制包括如下按质量百分比计的组分：

多聚赖氨酸	0.01%
精氨酸	0.1%
色氨酸	0.1%
酪氨酸	0.1%
聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-X-100）	0.001%（V/V）

余量为碱性水 (PH = 8-10)。

3. 权利要求 1 或 2 所述的膜用生物高分子交联剂的制备方法，其特征在于包括如下步骤：取所述质量百分比的多聚赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸、Triton-X-100 和水，混匀得到膜用生物高分子交联剂。

4. 权利要求 1 或 2 所述的膜用生物高分子交联剂在核酸 / 蛋白领域中应用。

5. 根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于包括如下步骤：

(1) 将核酸 / 蛋白转印膜用上述膜用生物高分子交联剂溶液 20 ～ 40℃浸泡处理 5 ～ 30 秒；

(2) 步骤 (1) 处理过的核酸 / 蛋白转印膜干燥后用于 blotting 技术。

6. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于：

步骤 (1) 中所述的浸泡处理为室温浸泡处理 10 秒；

步骤 (1) 中所述的核酸 / 蛋白转印膜为 PVDF 膜、硝酸纤维素膜或尼龙膜。

7. 根据权利要求 5 所述的应用，其特征在于：

步骤 (2) 中所述的 blotting 技术指 Southern Blotting、Northern blotting、Western blotting 和 / 或 Dot blotting。

一种膜用生物高分子交联剂及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，涉及一种膜用生物高分子交联剂及其制备方法与其在核酸 / 蛋白领域的应用。

背景技术

[0002] Blotting 技术是核酸和蛋白检测的一大常用基本技术。核酸是以 Northern blotting 为代表，蛋白以 Western blotting 为代表。这两大技术是分子生物学中最经典最常用的基本技术。它们共同的一点是要将生物分子固定在商品膜上。核酸的固定方法有高温干燥和紫外交联两种方法，蛋白则主要用干燥方法。固定对于提高生物分子在膜上的结合能力以提高检测灵敏度极为重要。紫外交联和高温干燥必须特定的仪器来实现，而且交联的剂量和干燥的强度会对检测的灵敏度有很大影响 (Nucleic Acids Research，2004，32(22) :e175 ;Nucleic Acids Res. 2007 ;35(8) :e60 ;Nat Protoc. 2008 ;3(6) :1077-84)。另外，紫外照射对核酸蛋白分子有破坏作用，并且对人体也有伤害作用。蛋白通过干燥固定在膜特别是硝酸纤维膜上并不牢固，会在后面的漂流过程中损失，影响检测的灵敏度。

发明内容

[0003] 本发明的首要目的在于克服现有技术的缺点与不足，提供一种膜用生物高分子交联剂。

[0004] 本发明的再一目的在于提供一种上述膜用生物高分子交联剂的制备方法。

[0005] 本发明的另一目的在于提供上述膜用生物高分子交联剂的应用。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案实现 :

[0007] 一种膜用生物高分子交联剂，包括如下按质量百分比计的组分 :

[0008]

多聚赖氨酸	0.001～0.025%
精氨酸	0.05～0.2%
色氨酸	0.01～1%
酪氨酸	0.01～1%
聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-X-100）	0.0002～0.005% （V/V）

[0009] 余量为碱性水 (PH ＝ 8-10)。

[0010] 优选的，一种膜用生物高分子交联剂，包括如下按质量百分比计的组分 :

[0011]

多聚赖氨酸	0.01%

[0012]

精氨酸	0.1%
色氨酸	0.1%
酪氨酸	0.1%
聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-X-100）	0.001%（V/V）

[0013] 余量为碱性水 (PH = 8-10)。

[0014] 上述膜用生物高分子交联剂的制备方法包括如下步骤：取所述质量百分比的多聚赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸、Triton-X-100 和水，混匀得到膜用生物高分子交联剂。

[0015] 上述膜用生物高分子交联剂在核酸 / 蛋白领域中的应用。

[0016] 所述的膜用生物高分子交联剂在核酸 / 蛋白领域中的应用，包括如下步骤：

[0017] (1) 将核酸 / 蛋白转印膜用上述膜用生物高分子交联剂溶液 20 ～ 40℃浸泡处理 5 ～ 30 秒。

[0018] (2) 步骤 (1) 处理过的核酸 / 蛋白转印膜干燥后用于 blotting 技术（印迹技术）。

[0019] 步骤 (1) 中所述的浸泡处理优选为室温浸泡处理 10 秒。

[0020] 步骤 (1) 中所述的核酸 / 蛋白转印膜优选为 PVDF 膜、硝酸纤维素膜或尼龙膜。

[0021] 步骤 (2) 中所述的 blotting 技术（印迹技术）指 Southern Blotting(DNA 印迹技术)、Northern blotting(RNA 印迹技术)、Western blotting(蛋白质印迹技术) 和 / 或 Dot blotting(斑点印迹技术)。

[0022] 本发明基本原理是充分利用所述交联剂的强电荷效应等其它分子间作用力，与待固定核酸或蛋白相互作用，从而将核酸或蛋白固定在膜上。

[0023] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果：

[0024] (1) 本发明提供的膜用生物高分子交联剂能使核酸和蛋白直接交联到核酸 / 蛋白转印膜上，省去了固定核酸或蛋白对仪器的依赖。

[0025] (2) 将本发明提供的膜用生物高分子交联剂应用到 blotting 技术提高了核酸 / 蛋白的检测灵敏度，特别是对于特定的膜如硝酸纤维膜，因为硝酸纤维膜没有电荷也没有供有效紫外交联的化学基团如氨基，硝酸纤维膜是公认的检测灵敏度相对很低的膜。

附图说明

[0026] 图 1 是核酸膜用生物高分子交联剂固定 BCIP/NBT 显色结果图；其中，A：紫外交联，B：交联剂固定。

[0027] 图 2 是蛋白膜用生物高分子交联剂固定 BCIP/NBT 显色结果图；其中，A：风干固定，B：交联剂固定。

[0028] 图 3 是内源 RNA 分子的检测结果图。

[0029] 图 4 是内源蛋白分子的检测结果图。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述，但本发明的实施方式不限于此。

[0031] 实施例 1 膜用生物高分子交联剂的制备

[0032] 取 10mg 精氨酸、10mg 色氨酸、10mg 酪氨酸、1ul Triton-X-100（商品化为液体）溶于 10ml0.01％多聚赖氨酸溶液（商品化可得）混匀得到膜用生物高分子交联剂。

[0033] 实施例 2RNA 分子的检测

[0034] (1) 由 GenePharma（吉玛）公司合成 RNA 分子 miR-21 ;由上海博尚生物技术有限公司合成 biotin 标记的 DNA 探针 (miR-21 的反义序列）。

[0035] (2) 分别取上述合成 RNA 与 DNA 探针 10pmol 按 LHCD（液相杂交显色法）(X.Li, M.Ni, andY.Zhang, Methods85(2), 151(2012)) 进行液相杂交。

[0036] (3) 将尼龙膜用实施例 1 制备的膜用生物高分子交联剂室温浸泡 10 秒，风干或者按专业标准方法紫外交联。

[0037] (4) 取步骤 (2) 的杂交液 1μL 点于步骤 (3) 处理的尼龙膜上，风干。

[0038] (5) 接下来的步骤封闭和加入 ABC（亲合素生物素复合物）信号放大及其后的洗膜均按 LHCD（液相杂交显色法）(X.Li, M.Ni, and Y.Zhang, Methods85(2), 151(2012)) 进行。

[0039] (6) 使用碱性磷酸酶显色液 BCIP/NBT 显色 30 秒，再用水终止显色。

[0040] 结果如图 1 所示，1 :未加探针，2 :未加 RNA，3 :加无关的 RNA（吉玛公司合成通用对照），4 :加与 miR-21 相同的 DNA，5 :加 miR-21。结果表明，A 图的紫外交联对 RNA 分子的检测效果与 B 图的交联剂固定效果相当。

[0041] 实施例 3 蛋白分子的检测

[0042] (1) 由吉尔生化有限公司合成 FLAG TAG 肽段。

[0043] (2) 将硝酸纤维膜用实施例 1 制备的膜用生物高分子交联剂室温浸泡 10 秒，风干。

[0044] (3) 取步骤 (1) 的蛋白 50ng 点于步骤 (2) 处理的膜上，风干或者不用步骤 (2) 处理直接点样风干。

[0045] (4) 用质量体积比 10％ BSA（牛血清白蛋白）室温下将硝酸纤维素膜封闭 1 小时。

[0046] (5) 用 biotin 标记兔抗 FLAG TAG 抗体（购自上海博耀生物试剂有限公司）室温杂交 1 小时。

[0047] (6)TBST（按《分子克隆》配制）洗 3 次，每次 10 分钟。

[0048] (7) 用 ABC（亲合素生物素复合物）信号放大及其后的洗膜均按 LHCD（液相杂交显色法）(X.Li, M.Ni, and Y.Zhang, Methods85(2), 151(2012)) 进行。

[0049] (8) 使用碱性磷酸酶显色液 BCIP/NBT 显色 1min，再用水终止显色。

[0050] 结果如图 2 所示，1 :未加 FLAG TAG 蛋白，2 :未加兔抗 FLAG TAG 抗体，3 :加无关的蛋白（按文献 Acta Biochim Biophys Sin(2008) :855-863 表达的肽段 MacGAP-N），4 :FLAG TAG 蛋白和兔抗 FLAG TAG 抗体均加，5 :4 的重复点样。结果表明，A 图的风干处理对蛋白分子的检测信号强度明显低于 B 图的交联剂固定效果。

[0051] 实施例 4 内源 RNA 分子的检测

[0052] (1) 用 CO_2 气体法人道处死或断颈处死大鼠，用 Trizol 试剂提取大鼠肝脏 RNA（提取方法按照 INVITROGEN 公司 Trizol 试剂盒说明书操作）。

[0053] (2) 所提取的 RNA 用 biotin 标记的 DNA 探针 (miR-122 的反义序列）按 LHCD（液相杂交显色法）(X.Li, M.Ni, and Y.Zhang, Methods85(2), 151(2012)) 进行液相杂交。

[0054] (3) 将尼龙膜用实施例 1 制备的膜用生物高分子交联剂室温浸泡 10 秒，风干。

[0055] (4) 取步骤 (2) 的杂交液 1μL 点于步骤 (2) 处理的尼龙膜上，风干。

[0056] (5) 接下来的步骤封闭和加入ABC(亲合素生物素复合物)信号放大及其后的洗膜均按LHCD(液相杂交显色法)(X.Li,M.Ni,and Y.Zhang,Methods85(2),151(2012)) 进行。

[0057] (6) 使用碱性磷酸酶显色液BCIP/NBT显色1min,再用水终止显色。

[0058] 结果如图3所示,1:未加探针,2:未加RNA,3:加无关的RNA,4:加与miR-122相同的DNA分子,5:大鼠肝脏RNA。所示结果表明,本发明所制生物高分子交联剂能用于膜上检测内源性RNA分子。

[0059] 实施例5内源蛋白分子的检测

[0060] (1) 用CO_2气体法人道处死大鼠,用SIGMA公司蛋白提取试剂RIPA提取大鼠脑总蛋白。

[0061] (2) 将硝酸纤维素膜用实施例1制备的膜用生物高分子交联剂室温浸泡10秒,风干。

[0062] (3) 取步骤(1)的蛋白10μg划线状点于步骤(2)处理的硝酸纤维素膜上,风干。

[0063] (4) 用质量体积比10%BSA(牛血清白蛋白)室温下将硝酸纤维素膜封闭1小时。

[0064] (5) 用兔抗大鼠GS(谷氨酰胺合成酶)一抗(购自SIGMA公司)室温杂交1小时。

[0065] (6)TBST(按《分子克隆》配制)洗3次,每次10分钟。

[0066] (7) 用羊抗兔二抗(HRP标记)(购自ABCAM公司)室温杂交1小时。

[0067] (8)TBST洗3次,每次10分钟。

[0068] (9)ECL显色5分钟,X光片暴光5秒。

[0069] 结果如图4所示,1:未加一抗,2:未加二抗,3:一抗二抗都加。所示结果表明,本发明所制生物高分子交联剂能用于膜上检测内源性蛋白分子。

[0070] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

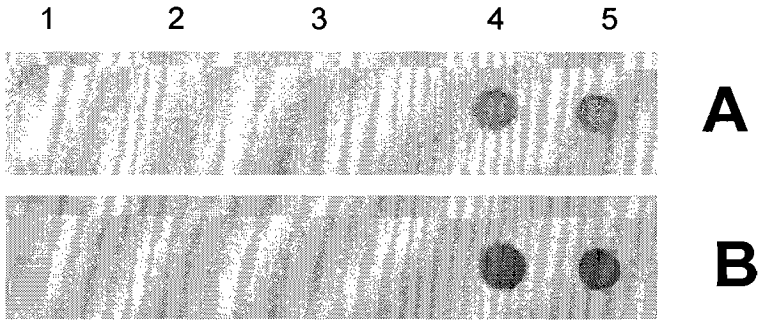

图 1

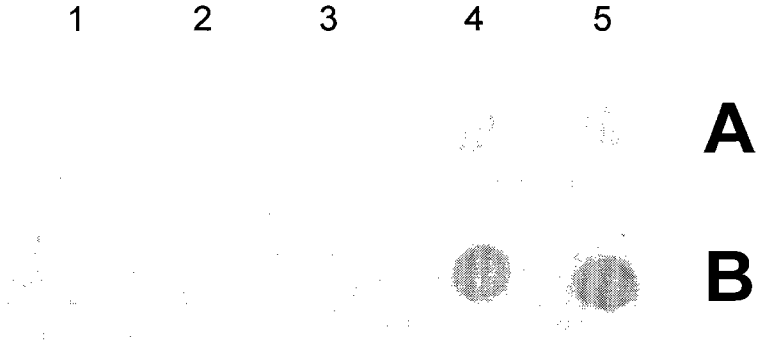

图 2

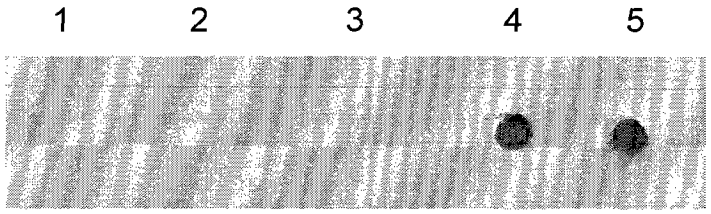

图 3

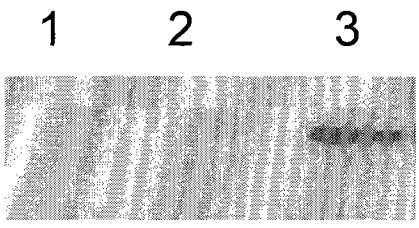

图 4