



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103242547 B

(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201310036047.9

(22)申请日 2013.01.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103242547 A

(43)申请公布日 2013.08.14

(73)专利权人 温州医科大学

地址 325035 浙江省温州市茶山高教园区
温州医科大学

(72)发明人 李湘麒 谭毅 张弛 梁广

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 裘晖

(51)Int.Cl.

C08J 7/00(2006.01)

C08J 3/24(2006.01)

C12Q 1/6834(2018.01)

G01N 33/545(2006.01)

G01N 33/548(2006.01)

(56)对比文件

CN 101348828 A,2009.01.21,

CN 102732619 A,2012.10.17,

CN 1381589 A,2002.11.27,

US 2008/0076125 A1,2008.03.27,

US 4455370 A,1984.06.19,

WO 9313405 A1,1993.07.08,

Anna Vařlořzi et al.Sensitive and
specific detection of microRNAs by
northern blot analysis using LNA-modified
oligonucleotide probes.《Nucleic Acids
Research》.2004,第32卷(第22期),e175.

Gurman Singh Pall et
al..Carbodiimide-mediated cross-linking
of RNA to nylon membranes improves the
detection of siRNA,miRNA and piRNA by
northern blot.《Nucleic Acids Research》
.2007,第35卷(第8期),e60.

Edouard W. Khandjian.UV crosslinking
of RNA to nylon membrane enhances
hybridization signals.《MOLECULAR BIOLOGY
REPORTS》.1986,第11卷(第2期),第107-115页.

审查员 许清强

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-1000.0002~0.005%(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。

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%,

余量为 pH=8~10 的碱性水;

其中,所述的多聚赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸、碱性水的百分比为质量百分比;所述的Triton-X-100的百分比为体积百分比。

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组分:

多聚赖氨酸	0.01%
精氨酸	0.1%
色氨酸	0.1%
酪氨酸	0.1%
Triton-X-100	0.001%(V/V)

余量为 pH=8~10 的碱性水;

其中,所述的多聚赖氨酸、精氨酸、色氨酸、酪氨酸、碱性水的百分比为质量百分比;所述的Triton-X-100的百分比为体积百分比。

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和碱性水,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印迹技术。

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)中所述的印迹技术指DNA印迹技术、RNA印迹技术、蛋白质印迹技术和/或斑点印迹技术。

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%

- | | | |
|--------|--------------------------|--------------|
| | 精氨酸 | 0.1% |
| [0012] | 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10ml 0.01%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2 RNA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, and Y.Zhang, Methods 85 (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, Methods 85 (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, Methods 85 (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CO₂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, Methods 85 (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CO₂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光片曝光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。

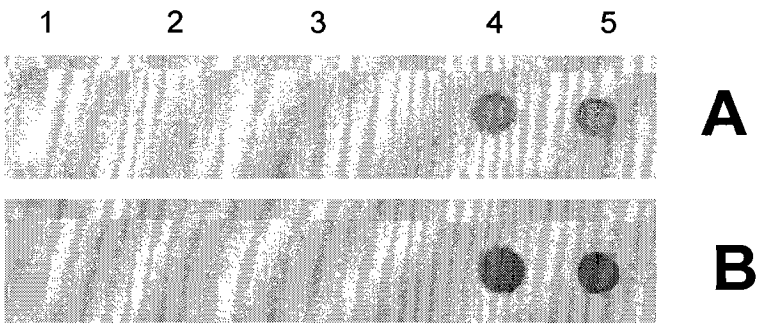


图1

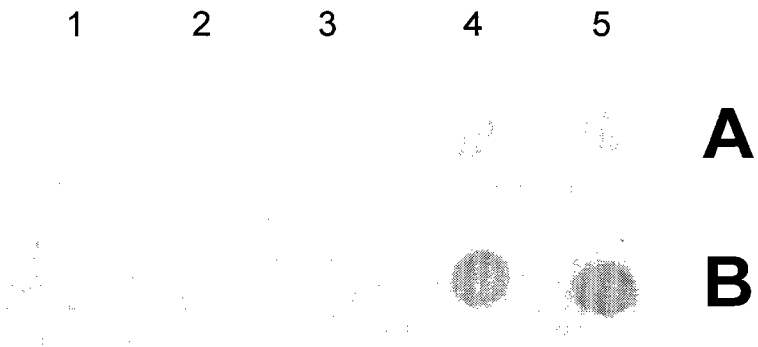


图2

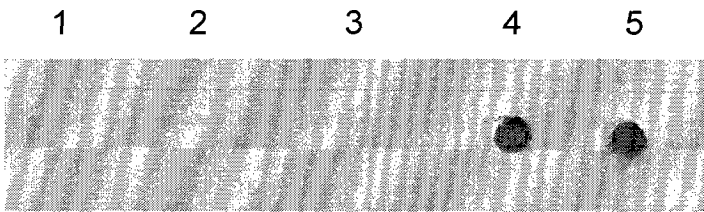


图3

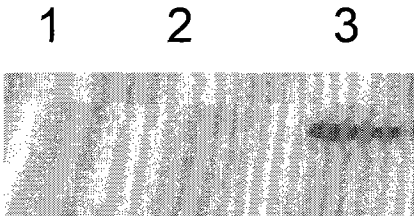


图4