



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114836368 A

(43) 申请公布日 2022.08.02

(21) 申请号 202210522270.3

G01N 30/72 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.13

(71) 申请人 杭州重链科技有限公司

地址 311215 浙江省杭州市萧山区宁围街
道传化科创大厦2幢4楼

(72) 发明人 高传杰 赵明红

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

专利代理师 赵杭丽

(51) Int. Cl.

G12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种线粒体纯化试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种线粒体纯化试剂盒,其包含一种生物素标记的抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001、链霉亲和素偶联的亲亲和材料以及相关其它材料。所述HC01-R001的重链和轻链氨基酸序列如SEQ ID No.1和SEQ ID No.2所示。所述链霉亲和素偶联的亲亲和材料包括载体基质和链霉亲和素,所述相关其它材料包括缓冲液、洗脱液和一次性耗材。本发明试剂盒能够特异性识别和吸附完整的人线粒体,经细胞破碎、线粒体吸附、杂质洗涤、线粒体洗脱等步骤,可得到纯化的完整人线粒体。该试剂盒具有速度快、纯度高、操作简单、对线粒体破坏小等优点,可应用于多种线粒体相关研究。

1. 一种线粒体纯化试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含一种生物素标记的抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001、链霉亲和素偶联的亲合材料以及相关其它材料。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述单克隆抗体HC01-R001的重链氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,轻链氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述链霉亲和素偶联的亲合材料包括载体基质和链霉亲和素,所述载体基质为能与链霉亲和素以化学键结合的表面环氧基活化的磁性微球或其它材料。

4. 根据权利要求1-3所述的试剂盒,其特征在于,所述单克隆抗体HC01-R001和链霉亲和素偶联的亲合材料能高亲和力结合,并特异性吸附人线粒体。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述相关其它材料包括缓冲液、洗脱液、一次性表面低吸附耗材。

6. 根据权利要求1-5所述的试剂盒在人类组织、体液内分离细胞和体外培养细胞线粒体的分离和纯化实验中应用。

7. 提供一种权利要求1-5所述试剂盒在病理诊断、生物学研究、生物质谱及蛋白质组学研究中应用。

一种线粒体纯化试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种线粒体纯化试剂盒。

背景技术

[0002] 线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器,细胞中制造能量的结构,细胞进行有氧呼吸的主要场所。线粒体拥有自身的遗传物质和遗传体系,但它的基因组大小有限,是一种半自主细胞器。除了为细胞提供能量外,线粒体还参与诸如细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程,并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力。

[0003] 线粒体是对各种损伤最为敏感的细胞器之一。在细胞损伤时最常见的病理改变包括线粒体数量、大小和结构的改变。人类线粒体出现问题会导致线粒体病,线粒体病是一大类遗传代谢病,线粒体病遗传方式复杂,导致疾病的原因主要由核基因和线粒体基因造成,临床表现复杂,确切病因的诊断十分困难,往往通过大分子酶学活性检测分析并结合遗传学基因分析的双重手段确定病因。线粒体内的蛋白质是线粒体执行正常功能的基础,线粒体损伤以及功能的改变往往伴随着线粒体内蛋白质组学的改变。线粒体蛋白质分为两部分,这是由线粒体的半自主性所引起的。大量线粒体蛋白在细胞质中合成,定向转运到线粒体。这些蛋白质在在运输以前,以未折叠的前体形式存在,与之结合的分子伴侣(属hsp70家族)保持前体蛋白质处于非折叠状态。通常前体蛋白N端有一段信号序列称为导肽、前导肽或转运肽,完成转运后被信号肽酶切除,就成为成熟蛋白,这种现象就叫做后转译。线粒体的蛋白合成能力有限,大约有很少的一部分是由线粒体自身的DNA进行编码,并翻译,因为它含有RNA、DNA聚合酶、RNA聚合酶、tRNA、核糖体、氨基酸活化酶等进行DNA复制、转录和蛋白质翻译的全套装备,说明线粒体具有独立的遗传体系。其过程大体与核基因相同。

[0004] 研究不同功能状态下线粒体蛋白质组学对于了解线粒体功能及相关疾病的发病机制有重要意义。但由于线粒体内的蛋白质大部分来源于胞浆,很多蛋白既存在于线粒体内,又大量存在于胞浆中,非线粒体特有,这为分析线粒体蛋白质组学带来了困难,必须获得纯度很高且包膜完整的活线粒体才可实现。目前,线粒体的分离纯化主要依靠蔗糖梯度密度分离法,或类似的密度分离法,该类方法分离的线粒体纯度很低,且操作复杂,需要昂贵的超离设备,耗时长,所用分离液及离心力对线粒体造成损伤严重,不能满足线粒体蛋白质组学研究的需要。虽有少量采用免疫磁珠分离的方法,但大多数采用敲入标签蛋白表达基因的方式,仅适用于细胞系,不适用于人体样本,而且无法将纯化的线粒体与磁珠分离。因此,迫切需要一种能够温和的、简便易行的线粒体快速纯化方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种线粒体纯化试剂盒,所述试剂盒包含一种生物素标记的抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001、链霉亲和素偶联的亲合材料以及相关其它材料。所述单克隆抗体HC01-R001的重链氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,所述单克隆抗体HC01-R001的轻链氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。所述链霉亲和素偶联的亲合材料包括

载体基质和链霉亲和素,所述载体基质为可与链霉亲和素以化学键结合的表面环氧基活化的磁性微球或其它材料。所述相关其它材料包括缓冲液、洗脱液和一次性耗材。

[0006] 所述一种生物素标记的抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001和链霉亲和素偶联的亲合材料可以高亲和力结合,并特异性吸附人线粒体,可以特异性地与人线粒体外膜蛋白OMP25胞外区结合。

[0007] 本发明的另一个目的是提供所述线粒体纯化试剂盒在人类组织、体液内分离细胞和体外培养细胞线粒体的分离和纯化实验中应用。

[0008] 本发明提供的线粒体纯化试剂盒可在病理诊断、生物学研究、生物质谱及蛋白质组学研究中应用。

[0009] 本发明提供的线粒体纯化试剂盒,由于具有特异性的生物素标记的抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001和链霉亲和素偶联的亲合材料,能够特异性识别和吸附人线粒体,通过磁珠分离纯化,并用含有高浓度生物素的洗脱液洗脱,得到高纯度的人线粒体,可用于病理诊断、生物学研究、生物质谱及蛋白质组学研究等。与其它方法比较,本发明中的优点包括:(1)操作快速简单,纯化全过程可在1小时内完成,且不需要昂贵的设备;(2)条件温和,对线粒体化学和物理损伤小;(3)线粒体纯度高;(4)线粒体包膜和功能完整;(5)可实现线粒体和磁珠的分离;(6)直接结合线粒体外膜蛋白,不需要借助于标签蛋白。

附图说明

[0010] 图1.从培养细胞系或组织中快速提取线粒体的步骤示意图。

[0011] 图2.不同方法纯化线粒体纯度比较。

[0012] 图3.不同方法纯化人线粒体蛋白种类数量比较。

[0013] 图4.不同方法纯化人线粒体蛋白各种类比例。其中A为本发明方法,B为蔗糖密度梯度离心法。

具体实施方式

[0014] 为了进一步理解本发明,下面结合附图和实施例,对本发明优先实施方案进行描述,但是应该理解,这些描述只是为进一步说明本发明,而不是本发明权利要求的限制。

[0015] 实施例1、抗人线粒体外膜蛋白OMP25单克隆抗体HC01-R001的生物素标记

[0016] (一)抗体超滤处理

- 1、于超滤柱中加入200 μ L标记反应溶液,加入500 μ g单克隆抗体HC01-R001,混匀,
- 2、4 $^{\circ}$ C,6000rpm,离心2min。弃滤液,
- 3、于超滤柱中加入100 μ L标记反应溶液,混匀。4 $^{\circ}$ C,Max 14000 \times g,2min,
- 4、重复步骤2 6到7次,
- 5、混匀超滤柱中的残留的液体,室温静置1min,
- 6、将超滤柱反转倒置于一新的超滤管中,4 $^{\circ}$ C,1000 \times g,2min,收集滤液,
- 7、取50 μ L PBS于超滤柱中混匀,静置1min,
- 8、倒置超滤柱,4 $^{\circ}$ C,6000rpm,2min。收集滤液,与步骤6的滤液合并,4 $^{\circ}$ C放置备用。

[0017] (二)生物素标记抗体

- 1、计算抗体标记需要生物素用量,

- 2、超滤后的滤液加入NHS-PEG4-Biotin溶液,室温反应1h,
- 3、葡聚糖凝胶分离纯化(去除游离生物素)。

[0018] (三) 凝胶过柱分离纯化标记抗体

- 1、凝胶除菌处理:超纯水冲洗柱子后,用0.5mol/L NaOH正向冲洗柱,流速3mL/min,冲洗3柱体积,
- 2、平衡:NaOH处理完毕后,用超纯水冲洗2柱体积,接着用含200mmol/L NaCl和20mmol/L PB的7.0PH缓冲液冲洗5~10倍柱体积,
- 3、上样:平衡完毕后,选择样品泵进行上样,上样流速3mL/min,上样体积为1mL,
- 4、洗脱:上样结束后,用平衡缓冲液进行洗脱,
- 5、清洗与保存:纯化结束后,用0.5mol/L NaOH反向冲洗2柱体积,冲洗时间30~60min,冲洗结束后,用超纯水正向冲洗5柱体积,再用20%乙醇冲洗3柱体积,然后拆下柱子,两端封死,低温保存。

[0019] 实施例2、链霉亲和素偶联磁性微球

- 1.取10mg表面环氧基活化的磁性微球,置于表面低吸附的1.5mL EP管中,加入1mL pH7.4的0.1M磷酸盐溶液,轻微震荡混匀,置于磁力架上,将磷酸盐溶液吸净丢弃;
- 2.重复上述洗涤步骤2次,洗净的磁性微球备用;
- 3.取100μg链霉亲和素,用pH7.4的0.1M磷酸盐溶液配置成1mg/mL,总体积100μL;
- 4.向100μL链霉亲和素溶液中逐滴加入3M硫酸铵溶液,每加入一滴及时混匀,防止沉淀,共加入100μL;
- 5.将200μL链霉亲和素和硫酸铵混合液高速离心1min,取上清液加入10mg磁性微球,混匀;
6. 30℃震荡孵育14h;
- 7.将孵育好的磁性微球置于磁力架上,吸净溶液;
- 8.加入1mL pH2.5的0.1M甘氨酸溶液,混匀后置于磁力架上,吸净溶液;
- 9.加入1mL pH8.8的10mM Tris溶液,混匀后置于磁力架上,吸净溶液;
- 10.加入1mL pH7.4的磷酸盐溶液,混匀后置于磁力架上,吸净溶液;
- 11.重复步骤102次,加入1mL pH7.4的磷酸盐溶液,混匀,置于4℃保存备用。

[0020] 实施例3、培养的HEK293细胞中的线粒体纯化

按照图1所示步骤,所用试剂包括PBS、缓冲液和洗脱液,其中缓冲液为含有5%BSA的PBS,洗脱液为含有2M生物素的PBS;所用一次性耗材包括低吸附的1.5mL和2mL规格的EP管、15mL离心管等。

- 1.收集培养在10cm培养皿中的HEK293细胞,约 $0.5-1 \times 10^8$ 个细胞,用4℃预冷的PBS洗涤3次后,重悬于1mL缓冲液中;
- 2.将上述细胞加入冰浴的2mL杜恩斯研磨器,快速研磨20-30次;
- 3.将上述研磨后的细胞悬液4℃700g离心5min,取上清置于15mL离心管中,用5mL预冷的缓冲液稀释;
- 4.取10μg生物素标记的HC01-R001溶于1mL缓冲液中,与10mg链霉亲和素偶联磁性微球混匀,4℃孵育2min;
- 5.将磁性微球置于磁力架上,吸净溶液,用1mL缓冲液洗涤3遍;

6. 将磁性微球加入上述稀释的线粒体溶液中,4℃旋转孵育5min;
7. 将混和液置于磁力架上,吸净溶液,用1mL缓冲液洗涤2遍;
8. 加入1mL含有2M生物素的洗脱液,4℃旋转孵育5min;
9. 将混和液置于磁力架上,吸取溶液至1.5mL低吸附EP管;
10. 4℃10000g离心5min,弃上清,用100μL PBS重悬沉淀的线粒体。

[0021] 实施例4、不同方法纯化线粒体纯度比较

将上述实施例3所述纯化线粒体与蔗糖密度梯度离心法纯化线粒体进行纯度比较,蔗糖密度梯度离心法纯化线粒体步骤如下:

[0022] 1. 收集培养在10cm培养皿中的HEK293细胞,约 $0.5-1 \times 10^8$ 个细胞,用4℃预冷的PBS洗涤3次后,重悬于1mL PBS中。

[0023] 2. 将上述细胞加入冰浴的2mL杜恩斯研磨器,快速研磨20-30次。

[0024] 3. 将上述研磨后的细胞悬液4℃700g离心5min,取上清,用5mL预冷的PBS稀释。

[0025] 4. 在用于Bockman SW28号转头的Uitradear离心管中,小心地在15ml 1.5mol/L的蔗糖溶液上加一层15ml 1.0mol/L的蔗糖溶液,形成30ml的梯度。

[0026] 5. 小心加入线粒体悬液(总体积6ml),4℃60000g(22000r/min)离心1h,线粒体会在1mol/L和1.5mol/L界面处形成一薄层。

[0027] 6. 用一巴斯德吸管轻柔的在1.5mol/L层顶部吸出线粒体。

[0028] 7. 稀释蔗糖溶液,17000g离心15分钟沉淀线粒体。

[0029] 8. 用30ml缓冲液洗一次,重悬浮于合适体积的适于后续工作的缓冲液中。

[0030] 9. 将上述两种方法获得的线粒体加入2X上样缓冲液,沸水煮5min后,进行Western Blot实验,分别用抗线粒体外膜蛋白、线粒体基质蛋白、胞浆蛋白、高尔基体蛋白的单克隆抗体检测,如图2所示,本发明所述方法纯化的线粒体样本中几乎不含胞浆蛋白及高尔基体蛋白等杂蛋白,说明纯化的线粒体纯度很高。

[0031] 实施例5、人线粒体蛋白组学分析

将本发明所述方法纯化的线粒体样本和蔗糖密度梯度离心法纯化线粒体进行蛋白质组学分析,比较两种方法所获得的样本蛋白质组学的差异。

[0032] 1、将线粒体样本加入2X上样缓冲液,沸水煮5min后,进行SDS-PAGE电泳,待样本电泳前沿跑至分离胶约1cm处后停止电泳。

[0033] 2、取出分离胶,用考马斯亮蓝快速染色,并用清水脱色。

[0034] 3、将蛋白质条带用切胶仪切胶,置于500μL EP管中,加入200/A1脱色液(100mmol/L硫代硫酸钠和30mmol/L铁氰化钾溶液按照1:1混合而成),静置30min后,弃去上清液。然后加200/ul水清洗,静置30min后弃上清液。重复该步骤直至胶粒变为无色。

[0035] 4、在胶粒中加入200ul乙腈静置30min后,弃上清液。重复该步骤至凝胶完全脱水变白。将乙腈吸出舍弃后,将胶粒置于37℃至完全干燥。

[0036] 5、测序级的胰蛋白酶用20mmol/L碳酸氢铵溶液配制为浓度12.5ng/ml后,加入适量酶液于胶粒中,并于4~C放置30rain使胶粒完全泡涨。然后吸出多余的酶液弃去,以防止质谱检测时出现过多的胰蛋白酶自身降解的肽段。

[0037] 6、加约5ul的25mmol/L碳酸氢铵溶液覆盖胶粒,以防止溶液在酶解过程中干涸。置于37℃控温箱内保温12~16h。

- [0038] 7、酶解后的胶粒用60u1的0.1%TFA和50%乙腈提取3次,每次20min,合并提取液。
- [0039] 8、在氮气流中将溶液吹干,然后进行LC-MS/MS鉴定。
- [0040] 9、结果如图3所示,蔗糖密度梯度离心法纯化线粒体鉴定出151种蛋白,本发明所述方法鉴定出78种蛋白,其中57种为两种方法均能鉴定到的蛋白;如图4所示,本发明所述方法纯化样本中线粒体蛋白占鉴定出的总蛋白的88%,蔗糖密度梯度离心法纯化样本中线粒体蛋白仅占鉴定出的总蛋白的42%,说明本发明所述方法纯化线粒体纯度更高。

序列表

<110> 杭州重链科技有限公司

<120> 一种线粒体纯化试剂盒

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 465

<212> PRT

<213> 人工序列(Unknow)

<400> 1

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1           5           10           15
Val Leu Ser Gln Ser Ala Arg Asn Gly Tyr Ala Gly Val Glu Glu Ser
           20           25           30
Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr
           35           40           45
Ala Ser Gly Phe Ser Val Ser Phe Tyr Thr Met Ala Trp Val Arg Gln
           50           55           60
Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Ser Ser Tyr Tyr Ala Ser Trp Ser Ser
65           70           75           80
Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala
           85           90           95
Thr Tyr Phe Cys Ser Ser Val Asp Phe Asp Ser Tyr His Phe Asn Ile
           100          105          110
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala
           115          120          125
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Gly Val
           130          135          140
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys
145           150          155          160
Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu
           165          170          175
Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu
           180          185          190
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Cys Lys Val Ala Lys Gly Arg Phe
           195          200          205
Thr Ile Ser Lys Thr His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ser Thr Ile
210           215          220

```


Val His Ser Asp Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Leu Leu
 20 25 30
 Ala Trp Tyr Gln Val Cys Val Ala Asn Lys Phe Tyr Pro Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60
 Ser Gly Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Met Thr
 65 70 75 80
 Lys Val Glu Gly Leu Thr Phe Gly Ala Gly Gln Tyr Asn Ile Lys Arg
 85 90 95
 Asp Pro Val Ala Ser Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Ala Thr Ile
 100 105 110
 Leu Thr Ser Ala Lys Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
 115 120 125
 Gly Leu His Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Gly Thr Glu Phe
 130 135 140
 Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ser Pro Thr Val Leu Asn Ser Lys Thr Pro
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Glu Asp Leu Phe Pro Pro Ser Lys Glu Glu Leu Thr Thr
 165 170 175
 Gly Thr Ser Asp Ile Thr Val Thr Trp Lys Val Asp Gly Thr Thr Gln
 180 185 190
 Gln Ser Gly Ile Glu Asn Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu His Ser
 195 200 205
 Val Tyr Thr Cys Glu Val Val Gln Gly Ser Ala Ser Pro Ile Val Gln
 210 215 220
 Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 225 230

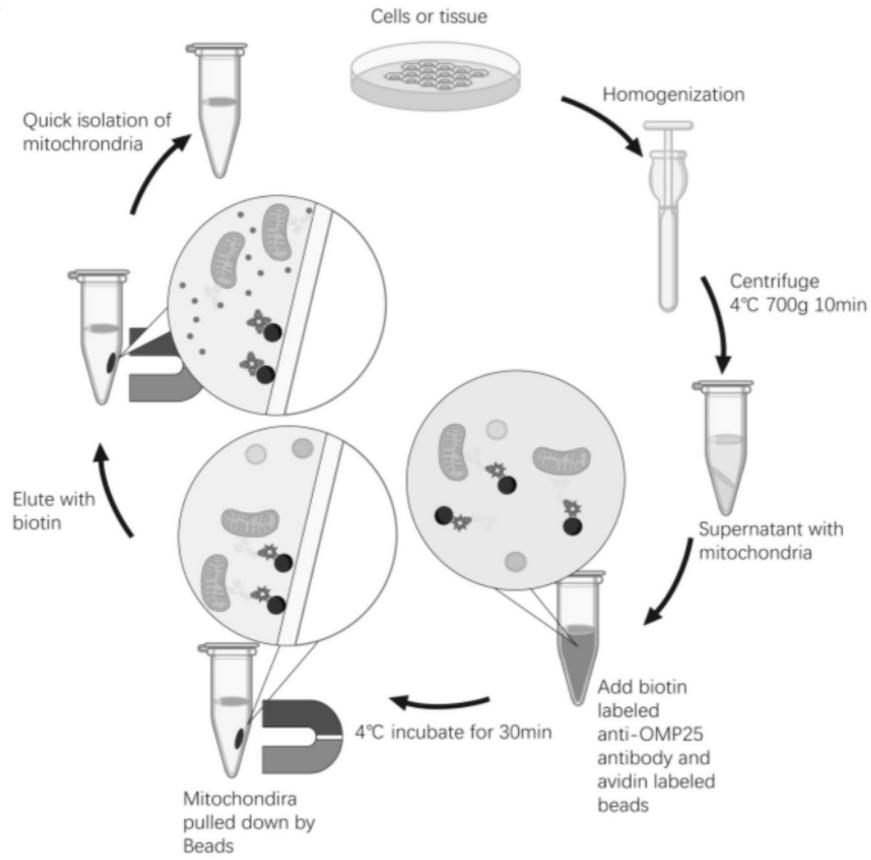


图1

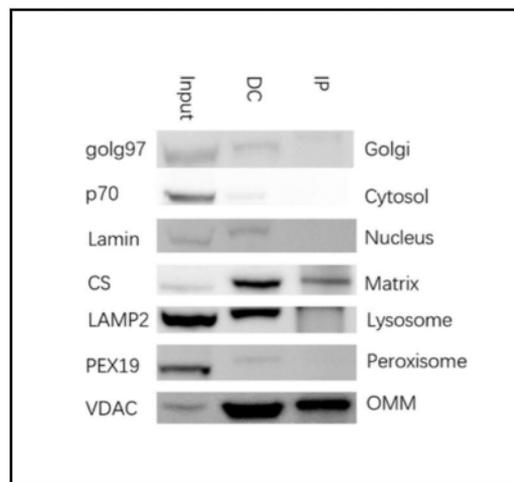


图2

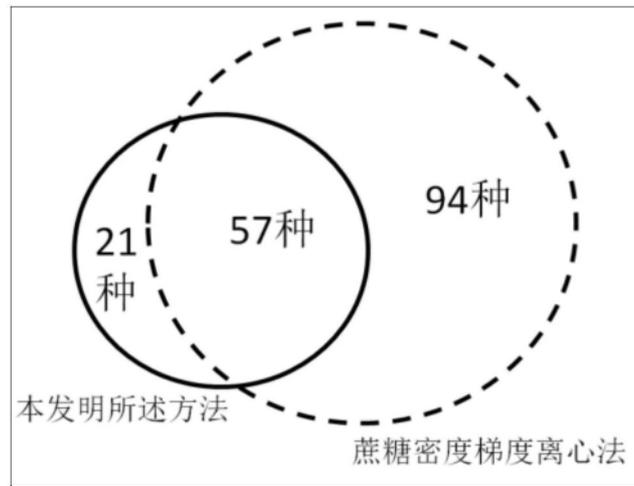


图3

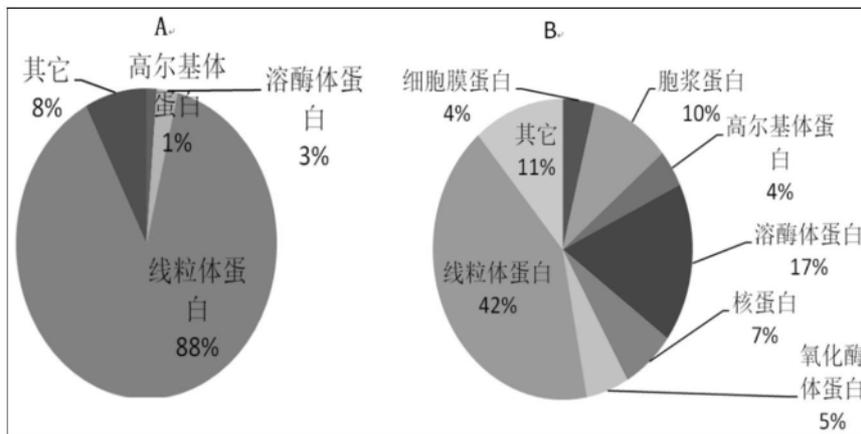


图4