



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103033630 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201210557080. 1

(22) 申请日 2012. 12. 20

(73) 专利权人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238 号

(72) 发明人 汝少国 王军 王蔚 田华

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
限公司 37201

代理人 张中南

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 21/78 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009/0274660 A1, 2009. 11. 05, 全文.

CN 102288754 A, 2011. 12. 21, 全文.

CN 102768282 A, 2012. 11. 07, 全文.

邴欣等. 真鲷 (*Pagrosomus major*) 卵黄
原蛋白的分离纯化及抗血清制备. 《高技术通

讯》. 2010, 第 20 卷 (第 12 期), 1309-1313.

罗胜军等. 三种方法纯化相思子毒素单抗的
比较. 《动物医学进展》. 2006, 第 27 卷 (第 11
期), 72-75.

杨帆等. 改良的硫酸铵沉淀法纯化大雁的卵
黄抗体. 《中国比较医学杂志》. 2007, 第 17 卷 (第
11 期), 625-628.

邴欣. 金鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清制备及
在内分泌紊乱化学物质检测中的应用. 《工程科
技辑》. 2007, 全文.

师晓栋. 玫瑰无须鲷卵黄蛋白原和卵黄脂磷
蛋白的纯化、鉴定、免疫分析和功能研究. 《中国
海洋大学研究生学位论文》. 2004, 正文第 54-58
页.

审查员 李宏悦

权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及
其应用

(57) 摘要

定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及
其应用。其试剂盒含有金鱼卵黄脂磷蛋白纯品与
鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。其制备方法
为首先纯化出金鱼卵黄脂磷蛋白,通过免疫小鼠
制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清,进一
步纯化获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。
本试剂盒可以用于鲤科鱼类卵巢和仔鱼体内卵
黄脂磷蛋白的鉴定和定性分析,避免了传统的糖、
磷、脂染色、氨基酸组成分析等复杂方法,在一
定程度上减少了财力、时间和工作量,并在提高工
作效率的基础上,极大得提高了检测敏感度,最低
检出限约为 100ng/ml。



1. 一种定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒,包括一个盒体,该盒体内装有:1) PVDF膜2张;2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支;3) 封闭液、洗涤液、显色液各1支,所述的洗涤液为TBST;封闭液为含5%脱脂奶粉的TBST;显色液为含质量体积比0.06%的3,3'-二氨基联苯胺的10mMTris-HCl;其特征在于该盒体还装有:4) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支;5) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体1支。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为100 μg/ml 金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

3. 如权利要求1所述的定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒,其特征在于所述的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品的制备方法如下:

取卵黄形成后期的雌性金鱼卵巢组织,去除结缔组织,收集鱼卵,加入3倍体积4℃预冷的匀浆缓冲液混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃,10000g离心20分钟,收集上清液;向上清液中缓缓加入(NH₄)₂SO₄粉末至70%的饱和度,盐析过夜;10小时后,在4℃下,以8000g离心10分钟,弃去上清,将沉淀重新溶解于25mM Tris-HCl,内含0.07M NaCl, pH7.5,获得卵匀浆提取液;

取1ml卵匀浆提取液加入Sephacryl S-300层析柱,用含0.07M NaCl的25mM Tris-HCl, pH7.5洗脱;收集含有金鱼卵黄脂磷蛋白的样品进行离子交换层析,用分别含0.07M、0.1M、0.2M、0.3M和1.0M NaCl的Tris-HCl缓冲液,25mM, pH7.5进行不连续洗脱,收集0.2M洗脱组分,鉴定为金鱼卵黄脂磷蛋白纯品。

4. 如权利要求3所述的定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒,其特征在于所述的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

采用腹腔注射雄性小鼠的方式,每只小鼠注射纯化的金鱼卵黄脂磷蛋白50 μg,注射前将等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀;此后,在第14、21、28、35、38天分别注射,注射剂量为50 μg,注射前将等体积抗原与弗氏不完全佐剂充分混匀;第40天采血,采血前一天停食;采用眼眶取血法取血,获得抗血清用于制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体;

采用硫酸铵沉淀的方法制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体:首先将鼠抗血清与阴性对照血浆2:1混合,4℃摇晃过夜,离心去除非特异性的抗体,然后加入(NH₄)₂SO₄粉末至20%的饱和度,4℃摇晃2个小时,离心除去纤维蛋白;加50%的饱和硫酸铵,4℃摇晃2个小时,离心除去白蛋白;加33%的饱和硫酸铵,4℃摇晃2个小时;4℃,8000g离心10分钟,即获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。

5. 权利要求1所述的鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白定性检测试剂盒,其特征在于该试剂盒在鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的鉴定中的应用。

6. 利用权利要求1所述的试剂盒定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

1) 将试剂盒中的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品和待测的样品稀释后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,所述的待测的样品包括从鱼类卵巢中纯化的蛋白、雌鱼卵巢匀浆液或者仔鱼的匀浆液;

2) 把电泳凝胶上的蛋白转印到PVDF膜;

3) 用封闭液封闭PVDF膜的非特异性结合位点,4℃孵育过夜,弃去封闭液;

4) 加入用封闭液按1:300的体积比稀释的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体,室温下

震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

5) 加入用封闭液按 1:500 的体积比稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

6) 加入显色液,待蛋白质条带清晰后,弃去显色液,用蒸馏水终止显色反应, PVDF 膜拍照后于避光处保存;

7) 在样品中发现有显色条带,表明纯化的蛋白为鱼类卵黄脂磷蛋白,颜色的深浅及条带的宽度代表了样品中卵黄脂磷蛋白的含量;或者利用光密度测定软件半定量分析各样品中卵黄脂磷蛋白的含量。

定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于水产养殖领域,具体涉及一种定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 鱼类的发育分为仔鱼期、稚鱼期、幼鱼期、未成熟期、成鱼期和衰老期,各时期的划分与鱼类性腺的发育有着直接的关系,对于雌鱼而言,其卵巢中主要的物质为卵黄蛋白,卵黄蛋白在鱼类整个生命周期中起着重要的作用。首先,卵黄蛋白是受精卵的重要物质,为鱼类胚胎发育和仔鱼早期生长提供营养物质和能量来源。其次,在卵黄生成期,卵细胞从血液中摄取卵黄原蛋白,经加工后以卵黄粒和油滴的形式储存于卵母细胞中,卵黄蛋白的含量直接影响胚胎的存活及仔鱼的生长发育。

[0003] 卵黄原蛋白由雌鱼的肝脏产生,随血液循环到达卵巢,在组织蛋白酶 D 的作用下,迅速裂解成三种主要卵黄蛋白:卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和 β' 组分,储存于卵黄粒中,其中以卵黄脂磷蛋白的含量最为丰富。与卵黄原蛋白相似,卵黄脂磷蛋白也是一种典型的糖脂蛋白,并且含有少量的磷,在胚胎的生长和发育过程中具有多种生物学功能。在卵母细胞的成熟过程中,卵黄脂磷蛋白进一步裂解,释放出脂质,并产生游离氨基酸,为胚胎与稚鱼提供蛋白质合成的原料和有氧能量生产的主要底物,并且在特定的发育时期提供所需的脂质。目前已经研究了黑线鳕、条斑星鲽、杂交鲟等多种鱼类卵黄脂磷蛋白在卵母细胞或胚胎发育过程中变化,并证实卵黄脂磷蛋白通过降解成游离氨基酸,为早期胚胎和稚鱼的发育提供能量和营养物质;卵黄脂磷蛋白还具备调节渗透压的功能,在卵细胞的发育过程中,浮性卵因吸收水分,体积显著增大,发育成熟时,浮性卵中水分含量达到 85~95%,卵细胞体积增大 3~5 倍,为胚胎的发育提供备用水。在这一过程中,游离氨基酸含量的增加,为产生水分流入所需要的渗透压起到重要作用,同时,水含量的增加提供了鱼卵漂浮在水体中所需的浮力。Reith 等 (2001)、Reading 等 (2009) 和 Ohkubo 等 (2006) 证实,浮性卵中的游离氨基酸主要来源于卵黄脂磷蛋白的重链;此外,卵黄脂磷蛋白还具备免疫学功能,在大多数情况下,鱼类的受精和发育要在水环境中进行,而水中往往含有能够引起多种疾病的病原体,在发育初期,胚胎和稚鱼无法合成足够的免疫相关分子,也未形成淋巴器官。因此,在免疫系统发育成熟之前,只能依靠母系物质抵挡入侵的病原菌。师晓栋 (2003) 发现玫瑰无须鲃的卵黄脂磷蛋白能够抵制多种病原菌的生长;Zhang J 和 Zhang SC (2011) 研究发现,玫瑰无须鲃的卵黄脂磷蛋白与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌具有很强的结合能力,并能够增强巨噬细胞的吞噬能力,推测卵黄脂磷蛋白既能够识别入侵的病原菌,又能诱发巨噬细胞消化病原菌,从而保护胚胎和稚鱼免受病害。

[0004] 可见,研究鱼类的卵黄脂磷蛋白对了解鱼类早期发育状况具有极大帮助。目前,国内外已经报道了多种鱼类卵黄脂磷蛋白的纯化与鉴定方法,但大多采用其含有糖、磷、脂基团的特性,采用特异性染色或者分析其糖、磷、脂含量来确定其是否为卵黄脂磷蛋白。这种方法是费时、费力,并且非常不经济。

[0005] 鲤科鱼类是鲤形目中分布最广、种类也最多的一群,全世界共有鲤科鱼类 210 属,2000 种以上,都是淡水鱼类,在我国各大河流、湖泊中广泛分布,也是我国自古以来农家鱼塘中主要的养殖鱼种。因此,开发鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的检测试剂盒具有广泛的应用前景和科学价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用,以克服现有技术的不足。

[0007] 一种定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒,包括一个盒体,该盒体内装有:1) PVDF 膜 2 张;2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支;3) 封闭液、洗涤液、显色液各 1 支,所述的洗涤液为 TBST;封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST;显色液为含 0.06%(m/V) 3'-二氨基联苯胺的 10mM Tris-HCl;其特征在于该盒体还装有:4) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支;5) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 1 支。

[0008] 上述金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为 100 μ g/ml 金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

[0009] 上述定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒制备方法,包括以下步骤:1) 制备金鱼卵黄脂磷蛋白纯品;2) 利用步骤 1) 得到的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体;3) 将步骤 1) 得到的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支、步骤 2) 得到的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清 1 支、PVDF 膜 2 张,以及封闭液、洗涤液、显色液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支共同装入盒体,得到鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白定性检测的试剂盒。

[0010] 上述试剂盒在定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白中的应用。

[0011] 目前国内外鉴定鱼类卵黄脂磷蛋白大多采用其含有糖、磷、脂基团的特性,采用特异性染色、氨基酸组成分析或者分析其糖、磷、脂含量来鉴定纯化的蛋白是否为卵黄脂磷蛋白,这种方法是费时、费力,并且非常不经济。此外氨基酸组成分析和糖、磷、脂含量测定对仪器的要求较高,操作复杂。而本发明的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,能够灵敏、方便地定性检测鲤科鱼类(包括金鱼、鲤鱼、鲫鱼、斑马鱼等)卵巢或仔鱼体内的卵黄脂磷蛋白,并且检出敏感度要明显高于以上方法。研究鱼类的卵黄脂磷蛋白对了解鱼类早期发育状况具有极大帮助,本发明能够为评价鱼类的生长和生殖状况提供重要参考。

附图说明

[0012] 图 1 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对金鱼卵黄脂磷蛋白的检测结果;

[0013] 图 2 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对鲤鱼卵黄脂磷蛋白的检测结果;

[0014] 图 3 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对鲫鱼卵黄脂磷蛋白的检测结果;

[0015] 图 4 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对斑马鱼卵黄脂磷蛋白的检测结果。

具体实施方式:

[0016] 一种定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒,包括一个盒体,该盒体内装有:1) PVDF 膜 2 张;2) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支;3) 封闭液、洗涤液、显色液各 1 支,

所述的洗涤液为 TBST ;封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST ;显色液为含 0.06%(m/V) 3'-二氨基联苯胺的 10mM Tris-HCl ;其特征在于该盒体还装有 :4) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支 ;5) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 1 支。

[0017] 上述金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为 100 μ g/ml 金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

[0018] 上述试剂盒中的 4) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品,是以如下方法制备的 :

[0019] 取卵黄形成后期的雌性金鱼卵巢组织,去除结缔组织,收集鱼卵,加入 3 倍体积 4 $^{\circ}$ C 预冷的匀浆缓冲液 (25mM Tris-HCl, 内含 70mM NaCl, 10mM EDTA 和 1mM PMSF, pH7.5) 混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4 $^{\circ}$ C, 10000g 离心 20 分钟,收集上清液 ;向上清液中缓缓加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 70% 的饱和度,盐析过液 ;10 小时后,在 4 $^{\circ}$ C 下,以 8000g 离心 10 分钟,弃去上清,将沉淀重新溶解于 25mM Tris-HCl (内含 0.07M NaCl, pH7.5), 获得卵匀浆提取液 ;

[0020] 取 1ml 卵匀浆提取液加入 Sephacryl S-300 层析柱,用含 0.07M NaCl 的 25mM Tris-HCl (pH 7.5) 洗脱,收集含有金鱼卵黄脂磷蛋白的样品用于离子交换层析 (DEAE-Sepharose FastFlow),用分别含 0.07M、0.1M、0.2M、0.3M 和 1.0M NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (25mM, pH 7.5) 进行不连续洗脱,收集 0.2M 脱组分,鉴定为金鱼卵黄脂磷蛋白纯品, -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0021] 上述试剂盒中的 5) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体,是以如下方法制备的 :

[0022] 采用腹腔注射雄性小鼠的方式,每只小鼠注射纯化的金鱼卵黄脂磷蛋白 50 μ g,注射前将等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀 ;此后,在第 14、21、28、35、38 天分别注射,注射剂量为 50 μ g,注射前将等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀 ;第 40 天采血,采血前一天停食。采用眼眶取血法取血,获得抗血清用于制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 ;

[0023] 采用硫酸铵沉淀的方法制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 :首先将鼠抗血清与阴性对照血浆 2:1 混合,4 $^{\circ}$ C 摇晃过夜,离心去除非特异性的抗体,然后加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 20% 的饱和度,4 $^{\circ}$ C 摇晃 2 个小时,离心除去纤维蛋白 ;加 50% 的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C 摇晃 2 个小时,离心除去白蛋白 ;加 33% 的饱和硫酸铵,4 $^{\circ}$ C 摇晃 2 个小时 ;4 $^{\circ}$ C, 8000g 离心 10 分钟,即获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体, -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0024] 经过以上操作,得到的定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒具体组成如下 :

[0025] 1) PVDF 膜 2 张 ;

[0026] 2) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支,使用前用 PBS 稀释至 1 μ g/ml ;

[0027] 3) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 1 支,使用前用封闭液按 1:300 的体积比稀释 ;

[0028] 4) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支,使用前用封闭液按 1:500 的体积比稀释 ;

[0029] 5) 封闭液、洗涤液、显色液各 1 支,所述的洗涤液为 TBST (100mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5) ;封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST ;显色液为含 0.06%(m/V) 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 的 10mM Tris-HCl,使用前向显色液中加入 0.05%(v/v) 双氧水。

[0030] 本发明的试剂盒可用于鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的定性检测。

[0031] 利用本发明的试剂盒定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的方法,具体包括以下步

骤：

[0032] 1) 将试剂盒中的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品和待测的样品稀释后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,所述的待测的样品包括从鱼类卵巢中纯化的蛋白、雌鱼卵巢匀浆液或者仔鱼的匀浆液；

[0033] 2) 把电流凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜；

[0034] 3) 用封闭液封闭 PVDF 膜的非特异性结合位点,4℃孵育过夜,弃去封闭液；

[0035] 4) 加入用封闭液稀释的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 (1:300),室温下震荡孵育,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次；

[0036] 5) 加入用封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1:500),室温下震荡孵育,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次；

[0037] 6) 加入显色液,待蛋白质条带清晰后,弃去显色液,用蒸馏水终止显色反应,PVDF 膜拍照后于避光处保存；

[0038] 7) 在样品中发现有显色条带,表明纯化的蛋白为鱼类卵黄脂磷蛋白,颜色的深浅及条带的宽度代表了样品中卵黄脂磷蛋白的含量多少；此外,可以利用光密度测定软件半定量分析各样品中卵黄脂磷蛋白的含量。

[0039] 如附图 1-4 所示,其结果依次为图 1 对金鱼卵黄脂磷蛋白的检测；图 2 对鲤鱼卵黄脂磷蛋白的检测；图 3 对鲫鱼卵黄脂磷蛋白的检测；图 4 对斑马鱼卵黄脂磷蛋白的检测。可以看到在 PVDF 膜上均出现了明显的条带,即本发明的试剂盒及其检测方法在定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白方面有很好的应用。

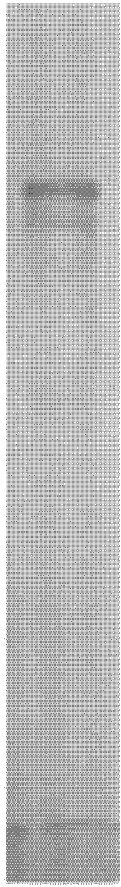


图 1

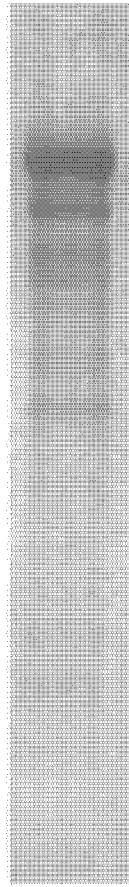


图 2

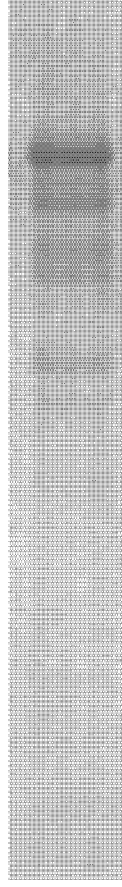


图 3

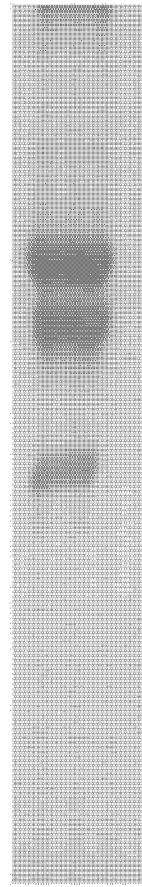


图 4

专利名称(译)	定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103033630B	公开(公告)日	2014-10-22
申请号	CN201210557080.1	申请日	2012-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	汝少国 王军 王蔚 田华		
发明人	汝少国 王军 王蔚 田华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N21/78		
代理人(译)	张中南		
其他公开文献	CN103033630A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用。其试剂盒含有金鱼卵黄脂磷蛋白纯品与鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。其制备方法为首先纯化出金鱼卵黄脂磷蛋白，通过免疫小鼠制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清，进一步纯化获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。本试剂盒可以用于鲤科鱼类卵巢和仔鱼体内卵黄脂磷蛋白的鉴定和定性分析，避免了传统的糖、磷、脂染色、氨基酸组成分析等复杂方法，在一定程度上减少了财力、时间和工作量，并在提高工作效率的基础上，极大得提高了检测敏感度，最低检出限约为100ng/ml。

