



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109254156 A

(43)申请公布日 2019.01.22

(21)申请号 201811233800.2

(22)申请日 2018.10.23

(71)申请人 山东出入境检验检疫局检验检疫技
术中心

地址 266002 山东省青岛市市南区瞿塘峡
路70号

(72)发明人 王松 李兆杰 赵祖亮 王骏
毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

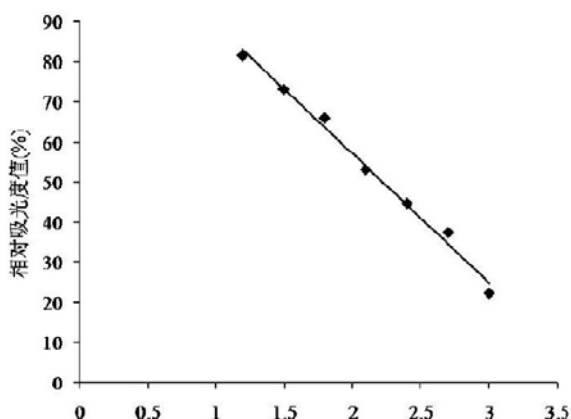
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

检测黄盖鲈鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测
试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种检测黄盖鲈鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒及其应用。该试剂盒含有黄盖鲈鱼卵黄原蛋白代谢产物卵黄脂磷蛋白纯品及其单克隆抗体,制备时,首先利用凝胶过滤和离子交换两步层析法从黄盖鲈鱼卵匀浆提取液中纯化出卵黄脂磷蛋白,然后通过杂交瘤细胞免疫制得卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体,并利用Hitrap Protein G层析,纯化获得鼠抗黄盖鲈卵黄脂磷蛋白单克隆抗体。本发明的试剂盒可以用于海洋环境雌激素类药物的筛选,能够灵敏、方便的定性检测黄盖鲈鱼血液、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白,最低检测限为0.75ng/mL,为我国近岸海域内分泌干扰物的检测提供了重要依据。



1. 一种检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹试剂盒,包括一个箱体,盒体内有空白96孔酶标板1块,封闭液、包被液、洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各1支,其特征在于,该箱体还装有:黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支,鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体1支。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白纯品的制备方法如下:

解剖黄盖鲮后,采集成熟鱼卵,加入5倍体积的卵粗提液(20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA和100 mmol/L NaCl, pH 7.5),在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃,10000 g离心15 min,上清液用0.45 μm滤膜过滤后,分装1 mL;初步纯化采用Sephacryl S-300层析柱(2.0 × 80 cm),加入1 mL上述提取液,用25 mM Tris-HCl缓冲液(含0.07 M NaCl和1 mM PMSF,pH 7.5)匀速洗脱,洗脱流速为1 mL/min,自动分部收集器以每管3 mL收集各洗脱峰;进一步纯化采用离子交换层析,取上述洗脱组分上样,用含0.07 M NaCl的Tris-HCl缓冲液(25 mM,pH 7.5)进行洗脱,流速为1 mL/min,收集洗脱液,即为黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白。

3. 如权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述的鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体的制备方法如下:

取120 μg黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白,与完全佐剂混匀后对Balb/C小鼠进行腹腔注射,两周后再次免疫,免疫剂量为100μg,用不完全佐剂混匀后进行腹腔注射;每隔两周按以上方法进行免疫,第五次为加强免疫,在第四次注射后3天将100 μg不加佐剂的黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白分别注射入小鼠腹腔和尾静脉;将杂交瘤细胞(2×10^6 个/mL)注射入小鼠体内,小鼠腹腔已提前一周注射过灭菌的液体石蜡;待小鼠腹部膨大后,用50 mL注射器的针头穿刺引流取得腹水,从腹水中纯化即可获得单克隆抗体。

4. 权利要求1所述的检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白免疫印迹试剂盒在海洋环境雌激素类物质筛选与内分泌扰乱化学物质研究中的应用。

检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生态检测领域,具体涉及一种检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 持久性有机污染物((Persistent Organic Pollutants,POPs),是指在环境中难以分解,能够在环境中长期存在,可以通过各种传输途径而进行全球尺度的迁移扩散,通过食物链在生物体内累积放大,对人体和环境产生毒性影响的一类有机污染物。这些污染物并不是自然界本身就存在的,而是人类工业革命带来的产物。持久性有机污染物给人类和环境带来的危害已经成为全球性问题。为了解决这一问题,联合国环境规划署(UNEP)和瑞典政府于2001年5月23日在瑞典的斯德哥尔摩联合主持召开全权代表会议,签署了旨在禁止和/或限制使用12类持久性有机污染物的《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》。POPs具有下列四个重要的特性:(1)能够在环境中持久地存在;(2)能够经过长距离迁移到达偏远的极低地区。(3)在一定的浓度下会对接触该物质的生物造成有害或有毒影响,POPs大都具有“三致(致癌、致畸、致突变)”效应;(4)能蓄积在食物链中,对有较高营养等级的生物造成影响。由于POPs具有低水溶性、高脂溶性的特点,导致POPs从周围媒介中富集到生物体内,并通过食物链的生物放大作用达到中毒浓度。

[0003] POPs在海洋环境中难降解、分布广、易在生物体内富集,对生态环境的危害性很大,POPs不仅影响到海洋生物的栖息与繁殖,通过食物链的传递,也给人类自身生存和生活造成威胁。各项研究显示POPs浓度水平并不很高,但是由于其生物富集性可通过食物链传递富集,使得处于食物链越高的生物受到的威胁越大。在海洋环境和其他水生生态系统中,POPs的传播链是:空气中的POPs最初是被微生物吸收→较大生物吃微小生物→小鱼食用较大生物→大鱼吃小鱼→有时是鸟类或人类食用大鱼。食肉类物种体内的POPs含量将会达到其捕食对象体内POPs平均含量的10倍之多。这导致了在最高端食肉物种体内极高的POPs含量。根据环境加拿大(Environment Canada)组织的报告,食用鱼类的鸟蛋中POPs污染物达到鱼类本身生活的水中POPs含量的2500万倍。而位于生物链顶端的人类,则又把这些毒性放大了7万倍。

[0004] 当前急需全面提升海洋POPs实时监测、预警能力,对海水养殖的污染源进行研究,探讨鱼类饲料、人类活动及环境因素等对水产品质量的影响,为海水养殖产品的质量监控和海域环境的管理提供科学依据。因此建立起快速、高效、大通量针对POPs特别是新增加种类污染物的有效检测方法是加强和完善对环境中POPs的检测及风险控制管理的前提和基础。研究表明,大多数POPs具有环境雌激素效应,是环境雌激素类似物,因此可以将环境雌激素生物检测方法用于POPs的生物检测。

[0005] 美国、欧盟和日本相继建立起以鱼类为模式生物的环境雌激素筛选评价体系,其中卵黄原蛋白(Vitellogenin,Vtg)作为重要的生物筛选指标,已经得到广泛应用。鱼类卵黄原蛋白是卵黄蛋白的前体,是一种大分子量的脂磷聚糖蛋白。卵黄形成期,在雌激素的刺

激下卵黄原蛋白由肝脏合成,并通过血液运输到发育的卵巢中,被卵巢吸收;通常,卵黄原蛋白只能在卵黄形成期的雌鱼体内检测到,但是,雄鱼和幼鱼体内也含有卵黄原蛋白基因,在环境雌激素的诱导下,也能合成和分泌卵黄原蛋白。因此,卵黄原蛋白是环境雌激素筛选的特异性生物标志物,通过检测雄鱼体内卵黄原蛋白水平可以评价环境化学物的雌激素活性。然而,至今我国还鲜有海洋环境POPs生物监测技术的研发。

[0006] 黄盖鲽 (*Pseudopleuronectes yokohamae*), 俗称沙板, 属鲽形目、鲽科、黄盖鲽属, 一般体长120~240mm, 为冷温性底层海鱼, 分布于北达朝鲜、鞑靼海峡及日本北海道南部以及东海北部到黄渤海等。黄盖鲽是黄海与渤海的重要经济鱼类之一, 在我国山东、辽宁等地大量养殖。黄盖鲽在市场上可以购买获得, 并且在实验室内易于饲养, 因此本研究选择该鱼种作为水产品的代表, 建立其卵黄原蛋白的定量检测技术, 有助于开展我国近岸海域POPs生物监测工作。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是: 提供一种检测黄盖鲽鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒, 以满足现有技术的上述要求。

[0008] 为解决上述技术问题, 本发明采用的技术方案是:

[0009] 本发明提供的一种检测黄盖鲽鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒, 包括一个盒体, 空白96孔酶标板1块, 包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止剂和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各1支, 其特征在于它还装有黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支、鼠抗黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体1支。

[0010] 上述定量检测黄盖鲽鱼卵黄原蛋白的ELISA试剂盒的制备方法, 其特征包括以下步骤: 1) 制备黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白纯品; 2) 利用步骤1) 得到的黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白纯品制备鼠抗黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体; 3) 将步骤1) 得到的卵黄脂磷蛋白纯品1支、步骤2) 得到的鼠抗黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体1支、以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各1支放入盒内, 得到检测黄盖鲽鱼卵黄原蛋白的ELISA试剂盒。

[0011] 所述的黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白纯品的制备方法如下:

[0012] 解剖黄盖鲽后, 采集成熟鱼卵, 加入5倍体积的卵粗提液 (20mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA和100mmol/L NaCl, pH 7.5), 在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆, 4℃, 10000g 离心15min, 上清液用0.45μm滤膜过滤后, 分装1mL; 初步纯化采用Sephacryl S-300层析柱 (2.0×80cm), 加入1ml上述提取液, 用25mM Tris-HCl缓冲液 (含0.07M NaCl和1mM PMSF, pH 7.5) 匀速洗脱, 洗脱流速为1ml/min, 自动分部收集器以每管3ml收集各洗脱峰; 进一步纯化采用离子交换层析, 取上述洗脱组分上样, 用含0.07M NaCl的Tris-HCl缓冲液 (25mM, pH 7.5) 进行洗脱, 流速为1ml/min, 收集洗脱液, 即为黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白。

[0013] 所述的鼠抗黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体的制备方法如下:

[0014] 取120μg黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白, 与完全佐剂混匀后对Balb/C小鼠进行腹腔注射, 两周后再免疫, 免疫剂量为100μg, 用不完全佐剂混匀后进行腹腔注射; 每隔两周按以上方法进行免疫, 第五次为加强免疫, 在第四次注射后3天将100μg不加佐剂的黄盖鲽鱼卵黄脂磷蛋白分别注射入小鼠腹腔和尾静脉; 将杂交瘤细胞 (2×10^6 个/mL) 注射入小鼠体内, 小

鼠腹腔已提前一周注射过灭菌的液体石蜡;待小鼠腹部膨大后,用50mL注射器的针头穿刺引流取得腹水,从腹水中纯化即可获得单克隆抗体。

[0015] 上述定量检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的试剂盒在海洋内分泌扰乱化学物质调查与筛选中的应用。

[0016] 本发明的有益效果:

[0017] 本发明的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,可灵敏、准确、方便地检测黄盖鲮鱼血液中、体表粘液、肝脏组织和肝细胞培养液中的卵黄原蛋白,其检测范围为1.95~250ng/mL,为内分泌扰乱化学物质筛选、检测和生态环境风险评价提供了一个有效的手段。

[0018] 目前,国内外尚未见关于黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体制备的报道,本申请首次建立了黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体的制备方案,与多克隆抗体相比,单克隆抗体具有更高的抗原亲和力和专一性,基于单克隆抗体建立的检测方法具有更高的敏感度。本发现的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,能够灵敏、方便地定量检测黄盖鲮鱼在不同污染物暴露下体内卵黄原蛋白的生成水平,为评价我国近岸海域的环境雌激素效应提供了快捷的手段。

附图说明

[0019] 图1为本发明的试剂盒对黄盖鲮鱼卵黄原蛋白纯品的检测结果,横坐标为黄盖鲮鱼浓度对数值。

[0020] 图2为本发明的试剂盒对雌/雄黄盖鲮鱼血浆的检测结果,横坐标为样品稀释倍数的对数值。

具体实施方式

[0021] 实施例1

[0022] 制备检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹试剂盒分为以下步骤:

[0023] (1) 卵黄脂磷蛋白的分离纯化

[0024] 解剖黄盖鲮后,采集成熟鱼卵,加入5倍体积的卵粗提液(20mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L EDTA和100mmol/L NaCl, pH 7.5),在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃,10000g离心15min,上清液用0.45μm滤膜过滤后,分装1mL。初步纯化采用Sephacryl S-300层析柱(2.0×80cm),加入1ml上述提取液,用25mM Tris-HCl缓冲液(含0.07M NaCl和1mM PMSF, pH 7.5)匀速洗脱,洗脱流速为1ml/min,自动分部收集器以每管3ml收集各洗脱峰。进一步纯化采用离子交换层析,取上述洗脱组分上样,用含0.07M NaCl的Tris-HCl缓冲液(25mM, pH 7.5)进行洗脱,流速为1ml/min,收集洗脱液,即为黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白。

[0025] (2) 黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体的制备

[0026] 取120μg黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白,与完全佐剂混匀后对Balb/C小鼠进行腹腔注射,两周后再免疫,免疫剂量为100μg,用不完全佐剂混匀后进行腹腔注射。每隔两周按以上方法进行免疫,第五次为加强免疫,在第四次注射后3天将100μg不加佐剂的黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白分别注射入小鼠腹腔和尾静脉。将杂交瘤细胞(2×10^6 个/mL)注射入小鼠体内,小鼠腹腔已提前一周注射过灭菌的液体石蜡。待小鼠腹部膨大后,用50mL注射器的针头穿刺

引流取得腹水,从腹水中纯化即可获得单克隆抗体。

[0027] (3)将制备的黄盖鳎鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支、鼠抗黄盖鳎鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体1支、空白96孔酶标板一块,以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗1支装入盒体内,构成本发明的试剂盒。其具体组成如下:

[0028] 1)空白96孔酶标板1块;

[0029] 2)黄盖鳎鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支,使用前用样品稀释液稀释到所需浓度;

[0030] 3)鼠抗黄盖鳎鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体1支,使用前用包被液按1:5000的体积比稀释;

[0031] 4)辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支,使用前用样品稀释液按1:2000的体积比稀释;

[0032] 5)包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止剂各1支,

[0033] 所述的包被液为50mM pH 9.6碳酸盐缓冲液:1.59g Na_2CO_3 ,2.93g NaHCO_3 ,加蒸馏水至1000ml;

[0034] 洗涤液为含0.05%Tween-20的150mM pH7.4磷酸盐缓冲液:8.0g NaCl ,0.2g KCl ,2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.2g KH_2PO_4 ,0.5ml Tween-20,加蒸馏水至1000ml;

[0035] 封闭液为含2%BSA的pH7.4磷酸盐缓冲液:0.2g BSA溶于10ml pH7.4的磷酸缓冲液中;

[0036] 样品稀释液为含0.05%Tween-20、1%BSA的150mM磷酸盐缓冲液,pH 7.4:0.1g BSA溶于10ml洗涤液;

[0037] 显色液为北京诺博莱德科技有限公司生产的TMB单组分显色液;

[0038] 终止剂为2M的 H_2SO_4 水溶液。

[0039] 样品稀释液组成的确定

[0040] 样品稀释液一共分成5组,第1组:0.15M的PBS;第2组:PBST (0.15M的PBS,含tween-20 0.05%,pH 7.4);第3组:PBST (0.15M的PBS,含tween-20 0.05%,pH 7.4)+1%BSA;第4组:PBST (0.10M的PBS,含tween-20 0.05%,pH 7.4)+1%BSA;第5组:PBST (0.20M的PBS,含tween-20 0.05%,pH 7.4)+1%BSA,用浓度为20ng/ml的黄盖鳎鱼卵黄原蛋白标准品进行检测(方法参见实施例2),根据P/N值确定最佳的样品稀释液,具体结果如下:

[0041]

	P/N值
组1	3.5
组2	5.6
组3	17.8
组4	10.6
组5	12.3

[0042] 卵黄脂磷蛋白单克隆抗体的制备参数确定

[0043] 在卵黄脂磷蛋白单克隆抗体的纯化过程中,对多个参数进行调整,具体参数参见下表,除下表参数外,其余制备方法同实施例1中的步骤(2)。

[0044]

	对比例 1	对比例 2	对比例 3	对比例 4
对照阴性样品的用量	1/3	1/2	1/3	1/3
硫酸铵的饱和度	40%	50%	60%	50%
亲和纯化柱的选择	Hitrap Protein G	Hitrap Protein G	Hitrap Protein G	CNBr-activated Ssepharose4B

[0045] 对比例5:纯化步骤参见专利CN103033630A定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒及其应用的说明书中第023段(具体实施方式,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),其他制备方法同本发明实施例1步骤(2)。

[0046] 采用间接竞争法对实施例1及对比例1-4制备的单克隆抗体的效价进行测定,间接竞争法方法如下:①用0.05mol/L碳酸盐包被缓冲液(pH 9.6)将纯化的卵黄脂磷蛋白稀释至2 μ g/ml,在96孔酶标板的每孔中加入100 μ L,4 $^{\circ}$ C包被过夜。②洗涤:取出酶标板,恢复至室温,弃去包被液,用PBST(PBS-0.5%Tween 20)洗板3次,每次静置1min,弃去洗涤液,在吸水纸上将酶标板拍干。③封闭:向每孔中加入200 μ L封闭液(PBST-2%BSA),37 $^{\circ}$ C孵育2h。④加入抗血清:PBST洗板3次,每孔加入用稀释液(PBS-0.1%BSA)倍比稀释的抗血清(1:500~1:128 000),每孔加入100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育2h。⑤加入酶标二抗:PBST洗板5次,每孔加入100 μ L 1:4000倍稀释的HRP标记羊抗兔IgG(HRP-IgG),37 $^{\circ}$ C孵育1h。⑥显色:PBST洗板5次,每孔加入TMB单组分显色液100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光显色10min,以2mol/L H₂SO₄ 50 μ L终止显色,用Multiskan MK3酶标仪测定450nm吸光度。

[0047] 结果

[0048] 鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白的抗血清进行间接ELISA检测,经计算本发明实施例1制备的鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白抗血清的效价为1:32 000,对比例结果见下表。

[0049]

	对比例1	对比例2	对比例3	对比例4	对比例5
效价	1:4000	1:8000	1:8000	1:16000	1:8000

[0050] 实施例2

[0051] 本发明的检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹试剂盒可用于海洋内分泌扰乱化学物质的检测。检测方法包括以下步骤:

[0052] 1) 用包被液稀释试剂盒中的黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白至200ng/L,在空白96孔酶标板中加入100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,或者37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。弃去孔内溶液,洗涤3次。

[0053] 2) 在96孔酶标板中加入封闭液,300 μ L/孔,室温下孵育1小时。弃去孔内溶液,洗涤3次。

[0054] 3) 在96孔酶标板中加入用样品稀释液稀释了的黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品、待测样品50 μ L/孔,并在每孔加入50 μ L用样品稀释液1:5000倍稀释的鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白抗体,37 $^{\circ}$ C下孵育2小时。弃去孔内溶液,洗涤5次。

[0055] 4) 在96孔酶标板中加入用样品稀释液1:2000倍稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,100 μ L/孔,室温孵育1小时。弃去孔内溶液,洗涤5次。

[0056] 5) 在96孔酶标板中加入新鲜配制的显色液,100 μ L/孔,于室温暗处37 $^{\circ}$ C反应10min。

[0057] 6) 待呈现明显的黄色后加终止剂,50 μ L/孔。

[0058] 7) 用酶标仪测定450nm波长下各孔的吸光值,测定应在加终止液后15分钟以内进行。

[0059] 8) 计算:以标准物的浓度的对数值为横坐标,OD值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度;再乘以稀释倍数;或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的OD值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。具体结果参见图1。

[0060] 实施例3本发明试剂盒对雌/雄黄盖鲮鱼血浆的检测

[0061] 采用肌肉注射17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E₂)的方式诱导黄盖鲮鱼产生卵黄原蛋白。注射一周后取血,对血浆进行逐步稀释后;采用实施例2的方法对其进行检测,具体结果参见图2。

[0062] 实施例4最低检测限的确定

[0063] 取黄盖鲮鱼卵黄原蛋白标准品浓度为10ng/ml,逐步稀释至5、2.5、1.25、0.625、0.312和0.156ng/ml,采用实施例2的方法对各浓度标准品进行检测,每个浓度设置2个复孔,空白孔加入与标准品组等量的样品稀释液做为对照,以测得的P/N值大于2.1时的最低浓度做为最低检测限,经检测,本发明ELISA试剂盒的最低检测限为0.75ng/mL。

[0064] 当然,上述说明并非是对本发明的限制,本发明也并限于上述举例,本技术领域的普通技术人员,在本发明的实质范围内,作出的变化、改型、添加或替换,都应属于本发明的保护范围。

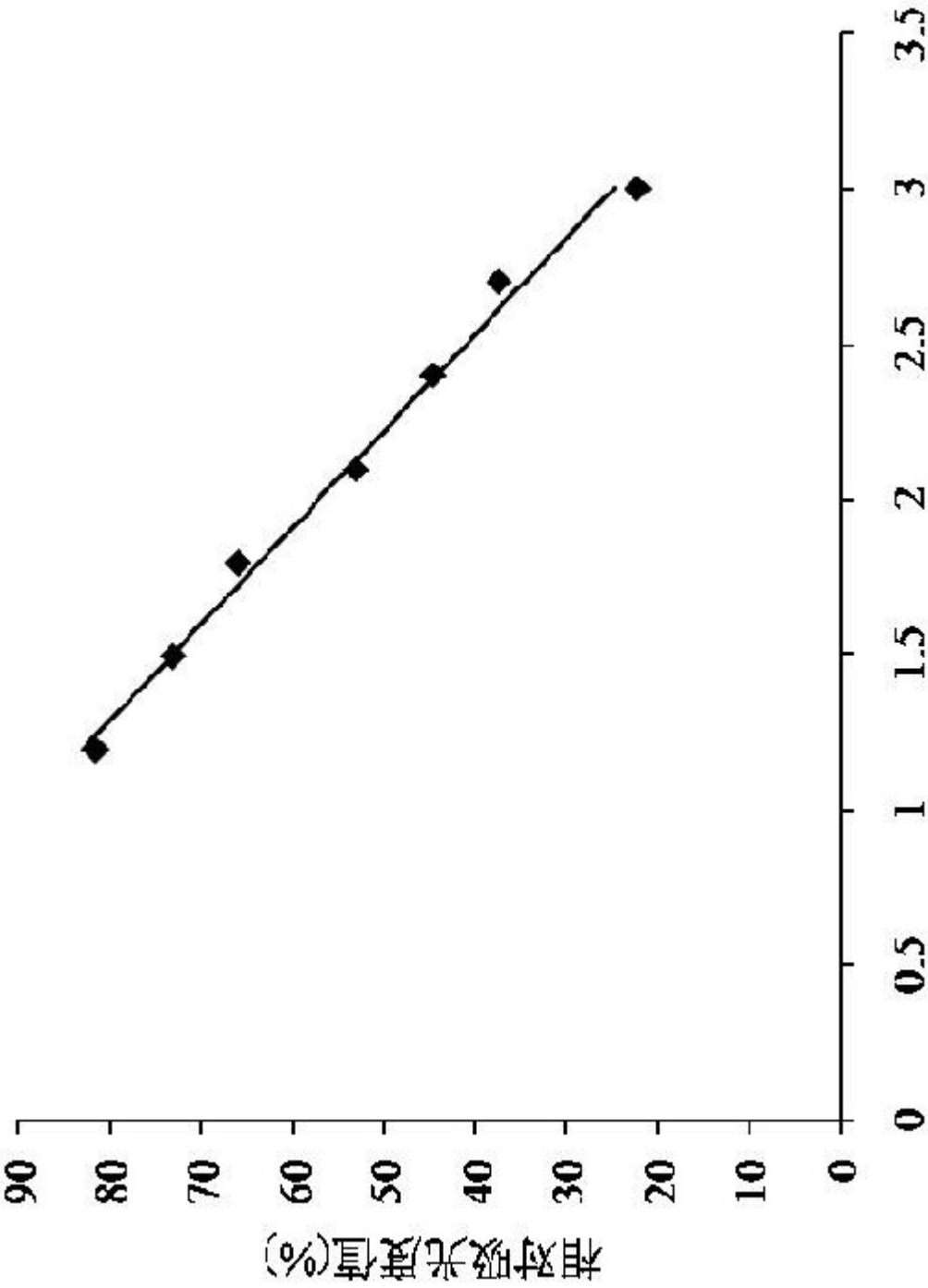
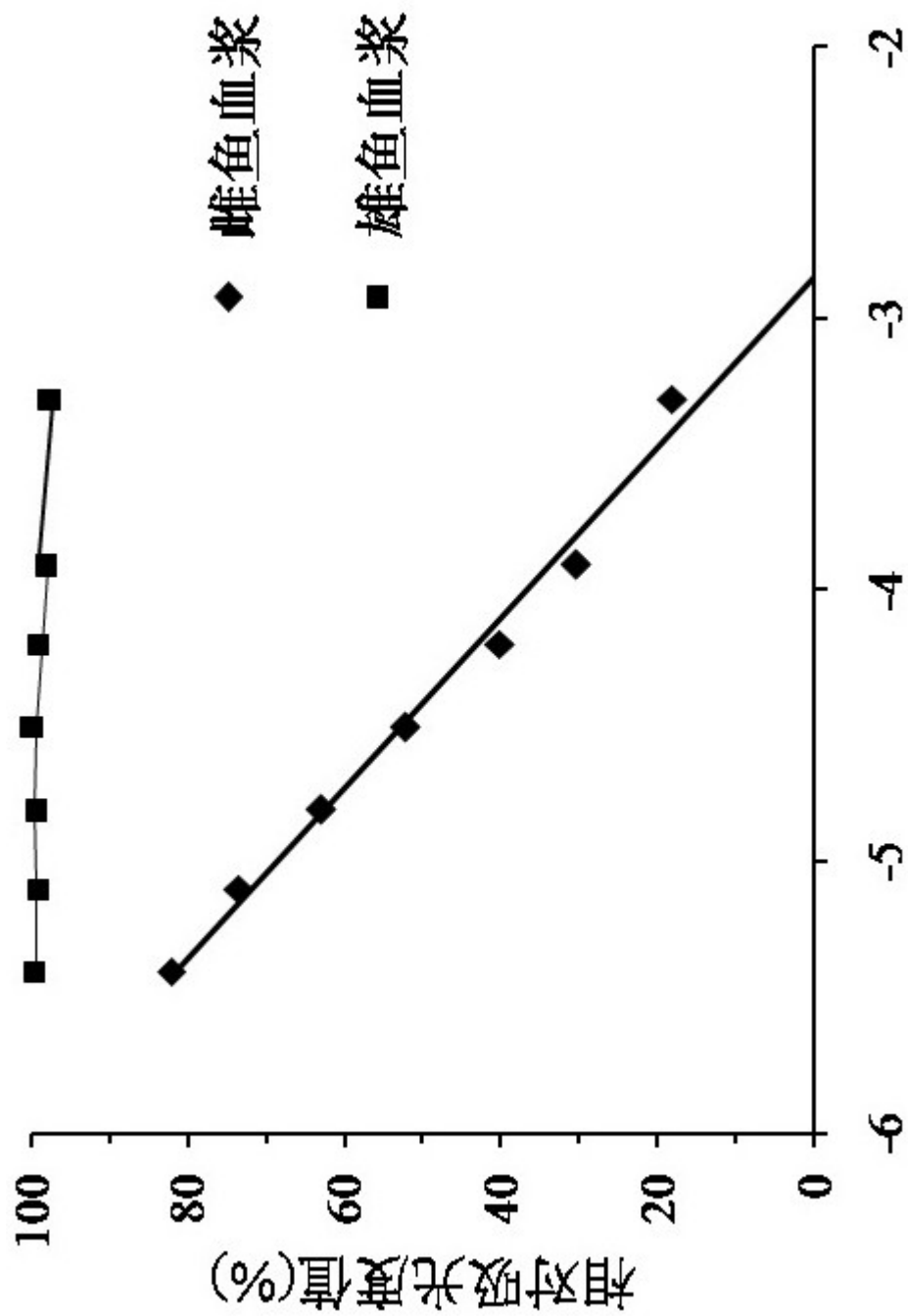


图1



专利名称(译)	检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN109254156A	公开(公告)日	2019-01-22
申请号	CN201811233800.2	申请日	2018-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	王松 李兆杰 赵祖亮 王骏 毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌		
发明人	王松 李兆杰 赵祖亮 王骏 毕乐飞 崔鹤 姜勇 相湛昌		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/74 G01N2333/47 G01N2333/575		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测黄盖鲮鱼卵黄原蛋白的免疫印迹检测试剂盒及其应用。该试剂盒含有黄盖鲮鱼卵黄原蛋白代谢产物卵黄脂磷蛋白纯品及其单克隆抗体，制备时，首先利用凝胶过滤和离子交换两步层析法从黄盖鲮鱼卵匀浆提取液中纯化出卵黄脂磷蛋白，然后通过杂交瘤细胞免疫制得卵黄脂磷蛋白的单克隆抗体，并利用Hitrap Protein G层析，纯化获得鼠抗黄盖鲮鱼卵黄脂磷蛋白单克隆抗体。本发明的试剂盒可以用于海洋环境雌激素类药物的筛选，能够灵敏、方便的定性检测黄盖鲮鱼血液、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白，最低检测限为0.75ng/mL，为我国近岸海域内分泌干扰物的检测提供了重要依据。

