

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 33/535 G01N 33/74



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02134936.3

[43] 公开日 2003年3月19日

[11] 公开号 CN 1403820A

[22] 申请日 2002.10.14 [21] 申请号 02134936.3

[71] 申请人 中山大学

地址 510275 广东省广州市新港西路135号

[72] 发明人 李文笙 冉雪琴 林浩然

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

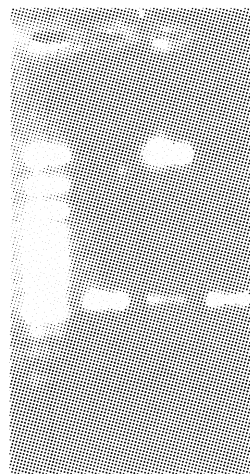
代理人 陈卫

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

[54] 发明名称 石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒由固相载体以及包被在其表面的纯化的抗石斑鱼生长激素的特异性抗体组成；该试剂盒的制备方法包括抗原、抗体的制备、抗体的纯化、纯化抗体的标记、试剂盒的制备等步骤；本发明的试剂盒，测试灵敏度可达到0.4ng/ml，为石斑鱼生长激素的研究提供了有效的检测手段。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒，其特征在于由固相载体以及包被在其表面的纯化的抗石斑鱼生长激素的特异性抗体组成。

2、如权利要求1所述的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述的固相载体为96孔聚苯乙烯酶标板。

3、如权利要求1或2所述的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒，其特征在于所述的抗石斑鱼生长激素的特异性抗体为抗斜带石斑鱼生长激素的特异性抗体。

4、权利要求1所述的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒的制备方法，其特征在于包括如下步骤：

(1) 抗原的制备：将克隆的石斑鱼生长激素基因在大肠杆菌中表达，得到的融合蛋白，经纯化后作为抗原；

(2) 抗体的制备：将(1)中的抗原免疫兔制备特异性的抗石斑鱼生长激素抗体；

(3) 抗体的纯化：(2)中所得的抗体经离心、沉淀、脱盐，得纯化抗体；

(4) 纯化抗体的标记：用酶标记(3)中所得的纯化抗体；

(5) 试剂盒的制备：用(3)中所得的纯化抗体包被固相载体。

5、如权利要求4所述的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒的制备方法，其特征在于所述的酶为辣根过氧化物酶。

石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及免疫化学试验物质,更具体地说是涉及一种石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

斜带石斑鱼属于鲈形目鱼旨科,主要分布在东南亚沿海近礁水域,为底栖肉食性鱼类,其肉质鲜美,营养价值很高,是我国南方重要的海水经济养殖鱼种。斜带石斑鱼的生长主要通过生长激素(Growth hormon, GH)调节。鱼类GH是由173-190氨基酸组成的单链蛋白质,分子量在20-23 KD之间。鱼类GH参与营养物质的能量代谢,在鱼类的生长、繁殖及渗透压调节等方面起重要作用。

研究GH对生长的调控,首先必须得到GH的纯品。最早鱼类GH分离工作可以追溯到1955年,Wilhelmi A E从鳕鱼垂体中分离出GH样蛋白,但未进行纯化。1976年Farmer首次从罗非鱼垂体中分离并纯化了GH。自此鱼类GH的分离纯化工作拉开了序幕。

随着研究的深入,GH含量的测定显得越来越重要。有人利用人GH放免测定系统测定了大麻哈鱼血清和垂体中的GH水平,事实上,人与大麻哈鱼GH的同源性仅为35%,显然,异源GH放免测定法缺乏特异性,灵敏度也很低。直到80年代,包括鲤鱼、大麻哈鱼、鲟鱼、鳗鲡、日本鳎等多种鱼类GH纯品纷纷获得,相应的特异性的抗体得以制备,为鱼类同源GH放免测定法的建立奠定了基础。1983年,Cook首次建立了鲤鱼GH同源放免测定系统,灵敏度达到5 ng/ml,之后,大鳞大麻哈鱼、罗非鱼、日本鳗鲡、胡子鲶等多种鱼类GH同源放免测定法相继建立,并成为目前鱼类GH水平测定的主要方法。

鱼类GH放免测定方法的原理与人的相同,主要采用具有放射性的同位素¹²⁵I标记GH纯品,与样品中的GH共同竞争特异性的一抗,加入相应的二抗,通过层析、离心等方法将结合抗体的标记抗原与未标记抗原分离,测定结合抗体的标记抗原的放射性比活,据标准曲线可算出样品中GH的含量。这种系统由于使用了放射性碘作为标记物,具有很高的灵敏度,同时采用特异的一抗与抗原结合,具有很好的特异性,但正因为使用了放射性标记物,使得此系统存在明显的缺点:高辐射危害人体健康,污染环境,高辐射对标记蛋白同样存在损害以及放射性碘的半衰期短(60天),使得标记物稳定性不够,需定期标记;同时¹²⁵I放出的 γ 射线能量很低,需灵敏的 γ 射线检测仪才能测出,这就

使得 GH 的放免测定技术难以在一般实验室应用,限制了放免分析方法的普及。

与放免测定技术相比,激素的酶联免疫测定具有无放射性污染,标记物稳定,标记酶来源广泛、经济,灵敏度、特异性与放免测定相当等特点,使得激素的酶免测定方法有望替代放免测定技术。但酶联免疫测定需要较多的激素标准品,用常规的垂体抽提技术需要大量的垂体。近年来,分子生物学的发展使得人们可以将鱼 GH 基因导入大肠杆菌中并在其中高效表达,经纯化后,可以满足酶联免疫测定的需要。1991年, Takahashi A 采用大麻哈鱼垂体分离纯化的天然 GH 制备特异性抗体,用重组大肠杆菌表达并纯化的 GH 标记上辣根过氧化物酶,建立了竞争性酶联免疫测定系统,测定了垂体孵育液中的 GH 水平,该系统可检测到每管 0.625ng GH。

发明内容

本发明的目的在于提供一种无放射污染、使用方便、灵敏度高的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒。

本发明的另一目的在于提供上述试剂盒的制备方法。

本发明的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒,由固相载体以及包被在其表面的纯化的抗石斑鱼生长激素的特异性抗体组成。

上述的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒,固相载体为 96 孔聚苯乙烯酶标板。

本发明的石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

(1) 抗原的制备:将克隆的石斑鱼生长激素基因在大肠杆菌中表达,得到的融合蛋白,经纯化后作为抗原;

(2) 抗体的制备:将(1)中的抗原免疫兔制备特异性的抗石斑鱼生长激素抗体;

(3) 抗体的纯化:(2)中所得的抗体经离心、沉淀、脱盐,得纯化抗体;

(4) 纯化抗体的标记:用酶标记(3)中所得的纯化抗体;

(5) 试剂盒的制备:用(3)中所得的纯化抗体包被固相载体。

上述的制备方法,所用的酶为辣根过氧化物酶。

本发明的试剂盒的使用方法,包括如下的操作步骤:

(1) 加入样品,使样品中的生长激素蛋白与载体上的抗体相结合,洗去未结合的多余的非特异性杂蛋白;

(2) 使结合的生长激素蛋白与酶标记的抗体相结合,洗去未结合的多余的酶标记物;

(3) 加入底物,室温作用,检测酶标记抗体中酶的催化活性。

本发明建立了双抗体夹心法测定样品中的生长激素水平,测试灵敏度可达到 0.4 ng/ml,为石斑鱼 GH 的研究提供了有效的检测手段。

附图说明

图 1 是斜带石斑鱼生长激素基因的表达结果；

图 2 是含斜带石斑鱼生长激素基因的融合蛋白的纯化结果。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明作进一步说明，但不以任何形式限制本发明。

实施例 1 本发明的检测试剂盒的建立过程

一、 抗原的准备：

以本申请人于 2002 年 5 月 24 日申请的“一种石斑鱼生长激素基因、含有该基因的载体、菌株及其表达产物的生产和应用”（申请号为 02115270.5）中所述的斜带石斑鱼生长激素基因出发制备抗原：

1. 材料与方法

A. 菌株

带有斜带石斑鱼生长激素基因插入片段的质粒 GpGH5， 表达质粒 pRSET-B 及其受体细胞 BL21 (DE3)。

B. 试剂

pGEM-T Easy Vector Systems (购自 Premega Corporation)；
Plasmid Miniprep Kit I、Gel Extraction Kit (Omega 产品)；
Ex Taq Polymerase、Kpn I、EcoR I、T4 DNA ligase (Takara Biotech 产品)；

100bp DNA Marker (MBI Fermentas 产品)；

Low Molecular Weight Protein marker (Sigma 产品)；

琼脂糖、Tris-base、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (Gibico 产品)；

TEMED、过硫酸铵、Tween-20 (Sigma 产品)；

羊抗兔-生物素、NBT-BCIP (购自华美生物工程公司)；

链亲和素-碱性磷酸酶 (购自北京鼎国生物技术发展中心)；

硝酸纤维膜 (PALL Gelman Laboratory Technical Service 产品)；

以下为国产分析纯试剂：重组黑棘鲷生长激素 (*Acanthopagrus butcheri* GH)、兔抗鲷鱼多克隆抗血清 (Rabbit Anti-*Acanthopagrus butcheri* Polyclonal Antiserum, RAB) 为 GroPep 公司产品 (Australia)。

C. 仪器

电泳仪及电转移系统为 Bio-rad 产品。

2. 斜带石斑鱼生长激素基因的克隆：

以斜带石斑鱼生长激素 cDNA 为模板，用正向引物：5`-TCATGGTACCCAGCCAATCACAGACGGCCAG-3`，反向引物：5`-GACTGAATT CCTACAGGGTACAGTTGGCCTC-3` 扩增出 560bp DNA 片段，用 Gel Extraction Kit 回收此 560bp 片段，Kpn I、EcoR I 双酶解 PCR 产物，胶回收纯化后，

与 Kpn I、EcoR I 双酶解的质粒 pBluscript-SK 连接，转化 DH5 α ，经筛选得到质粒 pBSK-rGH，酶切及 PCR 鉴定表明含 560bp 插入片段，胶回收此 560bp 片段，与 Kpn I、EcoR I 双酶解的质粒 pRSETB 连接，转化 BL21 (DE3) 细胞，用 X-gal、IPTG 在 Amp-LB 平板上筛选得到多个重组子，PCR、酶切鉴定出 9 个阳性克隆。

3. 斜带石斑鱼生长激素基因的表达及其检测：

阳性克隆 6pRSETB-rGH-BL21 用 0.4mM IPTG 于 0.5、1、2、4 小时诱导，检测表达情况。在 26KD 处有一条蛋白带呈逐渐增加趋势，受体细胞 BL21 无此带，未诱导的 6pRSETB-rGH-BL21 有很淡 26KD 带，经 Western Blot 表明，此带为重组 GH 蛋白带，见图 1，未诱导的 6pRSETB-rGH-BL21 有少量 GH 基础表达。凝胶扫描算出 IPTG 诱导 4 小时，GH 蛋白的表达量占细胞总蛋白 43 %。结果表明，质粒 6pRSETB-rGH 表达出的融合蛋白分子量为 26KD，高效表达，为下一步制备 GH 抗体打下了基础。

4. 融合蛋白的纯化：

(1) 细菌的培养：将质粒 6Prsetb-gGH 转化 BL21 受体细胞，过夜培养，按 1: 25-50 接种 1L LB 液体培养基，至菌液 OD600 为 0.6 时，加入 1mM IPTG 诱导培养 6 小时，5000g，30 分钟离心收集细菌。

(2) 细菌的裂解：将细菌颗粒悬于悬浮液 (10mM Tris.Cl pH7.1)，按 0.5 mg/ml 浓度加入溶菌酶，室温作用 30 分钟。-20℃冻融三次，以利于细胞裂解。将菌悬液于冰上用超声波打碎细胞，作用 3-6 次，30 秒/次，中间间隔 30 秒，使大部分细菌裂解。

(3) 包涵体的洗涤与溶解：用 9 倍体积的洗涤液 (10mM Tris.Cl pH7.1-0.1% Triton X-100) 悬浮细菌裂解物，4℃，12000g，30 分钟离心洗涤包涵体三次，得到纯净的包涵体。向包涵体中加入 200 ml 裂解液 (0.1 mM NaH₂PO₄-0.01 mM Tris.Cl pH8.0-8M Urea) 慢慢混匀，直至包涵体完全溶解，离心取上清，经 0.45um 微孔滤膜过滤，滤出液用于下步纯化。12 % SDS-PAGE 检测融合蛋白浓度情况。

(4) 融合蛋白的纯化：将融合蛋白溶液稀释成 200 ug/ml 浓度，用 HisTrap Kit (Amersham pharmacia Biotech) 亲和层析柱纯化目的蛋白，所用试剂为：

Charge buffer: 0.1 M NiSO₄

MTPBS: 150mM NaCl-16mM Na₂HPO₄-4mM NaH₂PO₄ Ph8.0

Binding buffer: 20 mM phosphate buffer pH7.6-0.5M NaCl-30 mM imidazole

Elution buffer: 20 mM phosphate buffer pH7.6-0.5M NaCl-400 mM imidazole

Strip buffer: 100mM EDTA-20 mM phosphate buffer pH7.6

操作:

1. 按试剂盒说明准备好 HisTrap 1ml 预装柱及以上试剂。
2. 用注射器加 10ml binding buffer 平衡柱
3. 加样品, 流速控制在 1-3ml/min.
4. 用 10ml binding buffer 洗柱, 收集洗出液.
5. 加 5ml elution buffer 洗脱, 按 1ml 每管收集洗脱液.
6. 以上各收集液上 SDS-PAGE 电泳检测, 合并含单一目的条带收集液, 于 20 mM phosphate buffer pH7.6 透析去 imidazole, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定目的蛋白的浓度, 分装后冻存于-80℃。

BCA 蛋白(Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit, Pierce)定量:

1. 按试剂盒说明准备 BCA 工作液及制作标准曲线
2. 取 150ul 样品, 加入 150ul BCA 工作液, 混匀作用 30 秒
3. 60℃温浴 1 小时, 取出冷至室温
4. 于 562nm 读 OD 值
5. 查标准曲线得到样品的蛋白浓度

结果见附图 2, 获得一条单一的蛋白带。

二、特异性抗体的制备

A、免疫程序: 自实验动物养殖中心购入成年新西兰大耳雄兔两只, 其中一只用做免疫兔, 另一只做对照。取纯化融合蛋白 100 ug 溶液, 与等体积 Freund 完全佐剂混匀, 采用四肢、背部皮下多点注射, 第一次注射 10 天后进行第二次免疫, 之后每周免疫一次, 最后一次注射 200 ug 进行加强免疫, 15 天后自颈动脉放血, 制备血清, 每次注射前自耳静脉采取 1ml 血用于效价测定。

B、直接 ELISA 测定抗体效价: 取纯化融合蛋白包被 96 孔板, 每孔 1ug 蛋白/100ul, 4℃包被过夜, 洗板三次后, 用 1% BSA 溶液封闭, 37℃作用 2 小时, 加入倍比稀释的血清, 每孔 100ul, 37℃半小时, 洗板三次, 每次 5 分钟, 加入 HRP-羊抗兔 IgG1 (1: 1000, 华美生物工程公司), 37℃半小时, 洗板三次后, 加入 OPD, 反应半小时后, 加入 2N H₂SO₄ 终止反应, 于 OD₄₉₀ 比色。测定结果如表 1:

表 1 抗体效价测定结果

| 免疫 | 时间 | 效价 |
|-------|-------|----------|
| 第一次免疫 | 10 天后 | 1: 64 |
| 第二次免疫 | 17 天后 | 1: 8000 |
| 第三次免疫 | 24 天后 | 1: 64000 |
| 第四次免疫 | 34 天后 | 1: 80000 |

三、抗体的纯化:

1、取 4.2 ml 斜带石斑鱼的特异性抗血清,加入等体积 4.2 ml PBS (0.01 M, Ph7.8), 混匀。

2、边搅边加入硫酸铵饱和溶液 8.4 ml, 使成 50% 饱和度, 4℃放 60 分钟。

3、4000 rpm 离心 20 分钟, 弃上清, 用饱和硫酸铵: PBS= 4.2 : 4.2 混合后的溶液清洗沉淀二次, 去上清。

4、将沉淀溶于 4.2 ml PBS 中, 滴加饱和硫酸铵溶液 2.1 ml, 使成 30 % 饱和度, 4℃放 30 分钟, 离心去上清, 重复该步一次。

5、脱盐: 沉淀溶于 0.84 ml 生理盐水, 移入透析袋中, 于生理盐水中透析至析出液中没有 SO_4^{2-} , 用 1% BaCl_2 溶液滴定检测 SO_4^{2-} 。再换一次透析液, 制得纯化抗体粗品 1.5ml。

四、纯化抗体的标记:

1、将 10 mg 辣根过氧化物酶溶于 0.2 ml 1.25 %戊二醛-0.1 M PBS (Ph6.8), 室温作用 18 小时, 透析去戊二醛。

2、加生理盐水至 1 ml, 加 5 mg 抗体, 加入 0.1 ml 1M 碳酸盐缓冲液 (Ph9.6), 4℃放 24 小时。

3、加入 0.1 ml 0.2 M 赖氨酸, 室温作用 2 小时, 于 0.15 M PBS (Ph7.2) 中, 充分透析。

4、离心去沉淀, 上清即为辣根过氧化物酶标记的抗体。

五、ELISA 检测斜带石斑鱼生长激素系统的建立及使用:

1、常规直接 ELISA 先预试酶标抗体的最适工作浓度为 1:600。用直接 ELISA 确定包被固相酶标板所用纯化抗体的最适浓度为 1: 800。

2、包被: 用 Ph9.5 碳酸盐缓冲液稀释前述纯化抗体 (1: 800), 包被 96 孔板, 100ul/孔, 4℃包被过夜, 阴性对照孔设 4 个/板, 用正常兔血清包被。空白对照孔设 4 孔/板, 加入包被液 100ul。包被液: 0.0 M Na_2CO_3 - NaHCO_3 buffer (Ph9.6)。

3、洗板, 用自动洗板机洗板三次, 5 分钟/次, 洗涤液为 TTBS (20 mM Tris-0.8% NaCl-0.1% Tween 20, Ph7.5)。

4、封闭: 用 1% BSA 封闭酶标板上没有结合上抗体的位点。200 ul/孔, 室温作用 1 小时。洗板。

5、加入样品或标准蛋白稀释液, 100-0.0457ng/ml, 100 ul/孔。样品稀释液: 1% BSA-TTBS, 室温作用 1 小时。阴性对照孔分别加入 100、11.1、1.235 ng/ml 标准蛋白溶液。洗板。

6、加入酶标抗体 (1: 600), 100ul/孔。

7、加底物: 底物中含: 0.1 M-柠檬酸盐缓冲液- 0.05 % (wt/V) 邻苯二胺-

0.025 % (V/V) H_2O_2 暗处反应 20 分钟，加入 2 N H_2SO_4 终止反应，50 μ l/孔，10 分钟后读取 OD490，空白管调零。样品测出 OD490 后查标准曲线得出样品中生长激素的含量。

8、此系统的灵敏度为 0.412 ng/ml 生长激素蛋白。

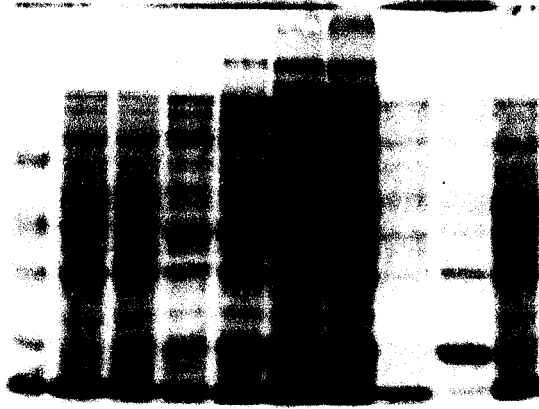


图 1



图 2

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1403820A | 公开(公告)日 | 2003-03-19 |
| 申请号 | CN02134936.3 | 申请日 | 2002-10-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 中山大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 中山大学 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 中山大学 | | |
| [标]发明人 | 李文笙 冉雪琴 林浩然 | | |
| 发明人 | 李文笙 冉雪琴 林浩然 | | |
| IPC分类号 | G01N33/535 G01N33/543 G01N33/74 | | |
| 代理人(译) | 陈卫 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了一种石斑鱼生长激素特异性酶联免疫检测试剂盒及其制备方法，该试剂盒由固相载体以及包被在其表面的纯化的抗石斑鱼生长激素的特异性抗体组成；该试剂盒的制备方法包括抗原、抗体的制备、抗体的纯化、纯化抗体的标记、试剂盒的制备等步骤；本发明的试剂盒，测试灵敏度可达到0.4ng/ml，为石斑鱼生长激素的研究提供了有效的检测手段。

