

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510010421.3

[43] 公开日 2006年4月26日

[11] 公开号 CN 1763090A

[22] 申请日 2005.10.11

[21] 申请号 200510010421.3

[71] 申请人 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所

地址 150070 黑龙江省哈尔滨市道里区松发街43号

[72] 发明人 张颖 孙大江 曲秋芝 刘海金

[74] 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所
代理人 单军

权利要求书1页 说明书7页

[54] 发明名称

鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及其应用

[57] 摘要

鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及其应用，它涉及用于鉴别鲟科鱼类雌雄的卵黄磷蛋白的制备方法及通过使用卵黄磷蛋白鉴别鲟科鱼类雌雄的方法。鉴于国内还没有建立使用鲟科鱼类卵黄磷蛋白来检测鲟科鱼类卵黄蛋白原的免疫学方法，国外只建立少数鲟科鱼类的酶联免疫法，本发明按照下述步骤进行制备：一、取鲟科鱼类的卵，低温高速匀浆和低温离心后，经饱和硫酸铵沉淀，凝胶柱分离纯化，透析除盐后，制备卵黄磷蛋白冻干粉；二、称取冻干粉，溶于生理盐水中，加入弗氏佐剂乳化，免疫大白兔，制备多克隆抗体，它可以用于鉴别鲟科鱼类雌雄。本发明具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、成本低等优点。

1、鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法，其特征在于所述鲟科鱼类卵黄磷蛋白检测方法的建立按照下述步骤进行制备：

一、鲟科鱼卵黄磷蛋白提取液的制备：

①称取鲟科鱼卵 5g 加入 15ml 预先预冷的 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液，高速匀浆，离心分离，弃沉淀，留上清液；

②上清液通过凝胶色谱柱洗脱；

③收集含卵黄磷蛋白的洗脱液，透析除盐，得到卵黄磷蛋白提取液；

二、鲟科鱼卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备：

①将鲟鱼卵黄磷蛋白提取液冷冻干燥为冻干粉，称取 1mg 的卵黄磷蛋白冻干粉溶于 1ml 生理盐水中，加入 1ml 弗氏完全佐剂，低温下乳化，动物皮下多点注射，进行初次免疫；

②第 28、38、48 天各背部皮下多点加强免疫一次，免疫剂量同第一次，采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液；

③55 天后，动物耳缘抽取少量血液测定抗体效价；

④心脏采血制备鲟科鱼卵黄磷蛋白抗血清。

2、根据权利要求 1 所述鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法，其特征在于凝胶色谱柱的填料为 sephadex G-100。

3、权利要求 1 所述鲟科鱼类卵黄磷蛋白的应用，其特征在于所述鲟科鱼类卵黄磷蛋白用于鉴别鲟科鱼类雌雄。

4、根据权利要求 3 所述鲟科鱼类卵黄磷蛋白的应用，其特征在于鉴别鲟科鱼类雌雄的方法为双向免疫扩散法、酶联免疫法和免疫胶体金快速检测法。

鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及其应用

技术领域

本发明涉及鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及通过使用卵黄磷蛋白鉴别鲟科鱼类雌雄的方法。

背景技术

鲟鱼的“鱼籽酱”是营养价值非常高的食品，号称“黑色黄金”，市场价格高达 2000~4000 美元/公斤。但是，鲟鱼生命周期长，性成熟晚（9 年以上），即使是成熟鲟鱼的性别也很难从外观上识别。为了生产鲟鱼籽酱，人们不得不将鲟鱼养殖到性成熟后，才能鉴别出雌雄。在长达 9 年多的培育时间里，由于其中有近一半的雄鱼，生产成本需增加一倍，浪费了大量的资金和生产能力（面积）。因此，探索鲟鱼性别鉴别方法，成为“鱼籽酱”生产者的一致呼声。

卵黄蛋白原是特异性地存在于卵生雌性动物血液中的一种蛋白质，由肝脏分泌的卵黄蛋白原入卵以后，在酶的作用下降解为卵黄蛋白。卵黄磷蛋白作为鱼类卵黄蛋白原的降解产物，是卵母细胞的主要蛋白成分和鱼类胚胎发育的重要营养和能量来源，其积累对卵母细胞的发育是十分重要的。卵黄蛋白原与卵黄磷蛋白在结构上具有相似性，可以通过免疫学的方法进行检测。而在正常环境下生活的雄鱼血液中不存在卵黄蛋白原，在本发明中只要测定出鲟科鱼类血液中有无卵黄蛋白原，便可知其性别。

目前，国内还没有使用鱼类卵黄磷蛋白建立鱼类及鲟科鱼类卵黄蛋白原的检测方法，国外也只建立少数鲟科鱼类的酶联检测法，而且都是应用基础实验和环境类荷尔蒙激素的检测。

发明内容

鉴于对国内还没有使用鱼类卵黄磷蛋白建立鱼类及鲟科鱼类卵黄蛋白原的检测方法，国外只建立少数鲟科鱼类的酶联检测法，而且都不是应用于鲟科鱼类的雌雄鉴别，本发明旨在提供一种鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及应用该技术进行鲟科鱼类性别鉴别。为达到上述目的，本发明采用以下技术方案制备鲟科鱼类卵黄磷蛋白：

一、鲟科鱼卵黄磷蛋白提取液的制备:

- ①称取鲟科鱼卵 5g 加入 15mL 预先预冷的 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 高速匀浆, 离心分离, 弃沉淀, 留上清液;
- ②上清液通过凝胶色谱柱洗脱 sphadex G-150;
- ③收集含卵黄磷蛋白的洗脱液, 透析除盐, 得到卵黄磷蛋白提取液;

二、鲟科鱼卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备:

- ①将鱼卵黄磷蛋白提取液冷冻干燥为冻干粉, 称取 1mg 的卵黄磷蛋白冻干粉溶于 1ml 生理盐水中, 加入 1ml 弗氏完全佐剂, 低温下乳化, 动物皮下多点注射, 进行初次免疫;
- ②第 28、38、48 天各背部皮下多点加强免疫一次, 免疫剂量同第一次, 采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液;
- ③55 天后, 动物耳缘抽取少量血液测定抗体效价;
- ④心脏采血制备鲟科鱼卵黄磷蛋白抗血清。

本发明直接从鱼卵中提取卵黄磷蛋白, 替代通过雌激素诱导鱼类肝脏合成卵黄蛋白原, 进而从血液中提取的方法。本方法制备的鲟科鱼卵黄磷蛋白可以用于检测鲟科鱼类的性别; 基于免疫学原理, 可分别采用双向免疫扩散法、酶联免疫法和免疫胶体金法进行检测, 三种检测方法的原理为:

(1) 双向免疫扩散原理, 即抗原、抗体在一定的介质中扩散相遇后可生成免疫沉淀复合物, 在介质内形成肉眼可见的免疫沉淀线。

(2) 酶联免疫吸附检测原理, 即标准抗原非特异性吸附于酶标板上后, 封闭多余的结合位点, 加入待检血清和酶标抗体, 除去多余的待检样品和酶标抗体后, 加入底物开始酶促反应, 并测定溶液的吸光度, 吸光度与待检样品中的卵黄蛋白原浓度成负相关。雄性鱼类有 100% 显色反应, 而雌鱼的显色则较弱。

(3) 免疫胶体金快速检测试纸条的原理是将特异性的抗体以条带状固定于硝酸纤维素膜上, 将胶体金标记试剂吸附在结合垫上。当待测样品血清加到试纸条一端的样品垫上后, 通过毛细作用向前移动, 溶解固化的结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应, 再移动至固定抗体的区域时, 待测物和金标试剂的复合物又与之发生特异性结合而被截留, 聚集在检测带上, 通过可目测的胶体金标记物得到直观的显色结果。

在本发明提供的方法中，有使用方便、简易、价格低廉的双向免疫扩散法；有检测准确、操作较复杂的酶联免疫法；还有使用方便、检测快速、价格适中的免疫胶体金快速检测法。上述方法不仅可以定性鉴别鲟科鱼类的性别，还可定量的检测多种鲟科鱼类血液中和组织中卵黄蛋白原的含量。

本发明可灵敏、准确地检测鲟科鱼类血清中卵黄蛋白原的有无，来鉴别鲟科鱼类的性别。与激素检测技术、解剖学方法、超声波检测等传统的鱼类性别鉴定方法相比，本方法具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、成本低等优点，而且对受检鱼损伤小，是进行鲟鱼类雌雄鉴别的理想方法。

具体实施方式

具体实施方式一：本实施方式按照下述方法制备鲟科鱼类卵黄磷蛋白：

一、鲟科鱼卵黄磷蛋白提取液的制备：

①称取鲟科鱼卵 5g 加入 15ml 预先预冷的 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液，高速匀浆，离心分离，弃沉淀，留上清液；

②上清液通过凝胶色谱柱洗脱；

③收集含卵黄磷蛋白的洗脱液，透析除盐，得到卵黄磷蛋白提取液；

二、鲟科鱼卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备：

①将鱼卵黄磷蛋白提取液冷冻干燥为冻干粉，称取 1mg 的卵黄磷蛋白冻干粉溶于 1ml 生理盐水中，加入 1ml 弗氏完全佐剂，低温下乳化，动物背部皮下多点注射，进行初次免疫；

②第 28、38、48 天各背部皮下多点加强免疫一次，免疫剂量同第一次，采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液；

③55 天后，动物耳缘抽取少量血液测定抗体效价；

④心脏采血制备鲟科鱼卵黄磷蛋白抗血清。

具体实施方式二：本实施方式以双向免疫扩散法鉴别鲟科鱼类雌雄为例，它包括如下步骤：

A、卵黄磷蛋白标准品的分离纯化：

①卵黄蛋白提取液的制备：称取鱼卵 5g 加入预先预冷的 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 15ml，10000rpm/min 高速匀浆，4℃、12000rpm/min 离心 20min，弃沉淀，留上清；

②上清通过凝胶色谱柱, 填料为 sephadex G-100, 层析柱用 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 2%NaCl 和 0.015%叠氮钠) 平衡, 加入 1mL 上清液用 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 2% NaCl 和 0.015%叠氮钠) 洗脱;

③ 收集含卵黄磷蛋白的洗脱液, 透析除盐后, 冷冻干燥为冻干粉。

B、卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备:

①称取 1mg 卵黄磷蛋白冻干粉, 溶于 1ml 生理盐水中, 加入 1ml 的弗氏完全佐剂, 低温下乳化, 大白兔背部皮下多点注射, 进行初次免疫;

②第 28、38、48 天各背部皮下多点加强免疫一次, 免疫剂量同第一次, 采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液;

③55 天后, 兔耳缘抽取少量血液测定抗体效价;

④心脏采血制备卵黄磷蛋白抗血清。

C、双向免疫扩散法检测:

①取琼脂糖 1g 溶于 0.02mol/l、pH=8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 (含 2% NaCl 和 0.015%叠氮钠) 100ml 中, 无菌倒入培养皿中, 冷却后, 打孔器打孔;

②中间空加入抗血清, 周围孔加待检血清, 37℃ 孵育 5 小时, 检查结果;

③结果判断: 待检血清孔与抗血清孔出现白色沉淀线的即为雌性, 不出现沉淀线的为雄性。

具体实施方式三: 本实施方式以酶联免疫法鉴别鲟科鱼类雌雄为例, 它包括如下步骤:

A、卵黄磷蛋白的分离纯化: 同双向免疫扩散法。

B、卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备: 同双向免疫扩散法。

C、酶标抗体的制备:

①称取 HRP (辣根过氧化物酶) 25mg 溶于体积浓度为 1.25%的戊二醛溶液中, 于室温静置过夜;

②反应后的酶溶液经 SephadexG-25 层析柱, 用生理盐水洗脱, 流速控制在 1ml/1 分钟, 收集棕色流出液, 如体积大于 5ml, 则以 PEG 浓缩至 5ml; 放置 25ml 小烧杯中, 缓慢搅拌;

③将待标记的抗体 12.5mg 用生理盐水稀释至 5ml, 搅拌下逐滴加入酶溶液中;

- ④用 1mol/l、pH=9.5 的碳酸缓冲液 0.25ml，继续搅拌 3 小时；
- ⑤加 0.2mol/l 赖氨酸 0.25ml，混匀后，置室温 2 小时；
- ⑥在搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵，置 4℃1 小时；
- ⑦混合液在 3000rpm/min 离心分离半小时，弃上清液，沉淀物用半饱和硫酸铵洗涤两次，最后沉淀物溶于 0.15mol/l、pH=7.4 的磷酸-磷酸盐缓冲液中；
- ⑧将上述溶液装入透析袋中，对 0.15mol/l、pH=7.4 的磷酸-磷酸盐缓冲液透析，去除铵离子后，在 10000rpm/min 离心 30 分钟去除沉淀，上清液即为酶结合物，分装后，冰冻保存。

D、酶联免疫法鉴别鲟科鱼类雌雄：

- ①在 96 孔酶标板每孔中加入卵黄磷蛋白标准品包被酶标板，4℃冰箱包被过夜 24h；
- ②弃去酶标板中的液体，每孔加入 360 μ l 封闭液，置于 4℃冰箱中封闭过夜 24h；
- ③弃去封闭液，每孔加入 300 μ l 洗涤液，轻微震荡 1min 后，弃去洗涤液，重复 3 次；
- ④每孔加入待检血清和酶标抗体，室温孵育 1h 后，弃去酶标抗体，洗涤 4 次；
- ⑤每孔加入 100 μ l 显色底物，室温暗处反应 20 分钟，加入 50 μ l 反应终止液，终止反应；
- ⑥依据有无显色反应判断鲟科鱼类的雌雄：与白色背景上，直接用肉眼观察结果，反应孔内颜色越深，阳性程度越强，为雌性鲟鱼；阴性反应为无色或极浅，为雄鱼。

本实施方式所设计的直接竞争法试剂盒组成如下：

包被好标准抗原的 96 孔酶标板(1 块)；

阴性对照一支 (200 μ l/支)；

酶标卵黄磷蛋白抗体 50 μ l，使用前稀释 1000 倍；

显色液、稀释液和洗涤缓冲液各一支；

终止液 (0.5mol/L H₂SO₄) 8ml。

注：稀释液：PBS 缓冲液，PH 7.4；洗涤液：含 0.05%Tween20 的稀释液；

封闭液：含 1%牛血清白蛋白的的稀释液；显色液：邻苯二胺溶液（OPD）。

具体实施方式四：本实施方式以免疫胶体金快速检测试纸条法鉴别鲟科鱼类雌雄为例，它包括如下步骤：

A、卵黄磷蛋白的分离纯化：同双向免疫扩散法。

B、卵黄磷蛋白多克隆抗体的制备：同双向免疫扩散法。

C、免疫胶体金的制备：

①胶体金颗粒的制备：用柠檬酸三钠—鞣酸混合还原剂可以得到比较满意的金溶胶，操作方法如下：取 4ml 质量浓度为 1%的柠檬酸三钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，加入 5ml 体积浓度为 1%的鞣酸、5ml、25mmol/L K_2CO_3 （体积与鞣酸加入量相等），以双蒸馏水补至溶液最终体积为 20ml，加热至 60℃取 1ml 体积浓度 1%的 HAuCl_4 加于 79ml 双蒸馏水中，水浴加热至 60℃，然后迅速将上述柠檬酸—鞣酸溶液加入，于此温度下保持一定时间，待溶液颜色变成深红色(约需 1 小时)后，将溶液加热至沸腾，保持沸腾 5 分钟即可。

②蛋白质的处理：由于盐类成分能影响金溶胶对蛋白质的吸附，并可使溶胶聚沉，故致敏前应先对低离子强度的水透析。必须注意，蛋白质溶液应绝对澄清无细小微粒，否则应先用微孔滤膜或超速离心除去。一般情况下应避免磷酸根离子和硼酸根离子的存在，因为它们都可吸附于颗粒表面而减弱胶体金对蛋白质的吸附。

③蛋白质最适用量的选择：将待标记的抗体稀释储存液作系列稀释后，分别取 0.1ml(含蛋白质 30 μg)加到 1ml 胶体金溶液中，另设一管不加蛋白质的对照管，5 分钟后加入 0.1ml 质量浓度为 10%的 NaCl 溶液，混匀后静置 2 小时，不稳定的金溶胶将发生聚沉，能使胶体金稳定的最适蛋白量再加入 10%蛋白质即为最佳标记蛋白量。

④标记：用 0.1mol/L K_2CO_3 或 0.1mol/L HCl 调节胶体金溶液 pH=6.5；于 100ml 胶体金溶液中加入最佳标记量的抗体溶液（体积为 3ml），搅拌 2~3 分钟；加入 5ml 体积浓度为 1%的 PEG20000 溶液；于 12000rpm/min 离心 40 分钟，吸去上清液（切忌倾倒）；将沉淀悬浮于一定体积分含 0.2~0.5mg/ml PEG20000 的缓冲液中，离心沉淀后，再用同一缓冲液恢复，浓度以 $A_{1\text{cm}}/540\text{nm}=1.5$ 左右为宜，以 0.5mg/ml 叠氮钠防腐，置 4℃保存。

⑤装配方法：膜的喷点：Test 线和 Control 线；膜的封闭；结合垫的处理；金标试剂的喷点；在塑料底板上分别将吸血清用玻璃纤维、冻干金标记抗卵黄磷蛋白玻璃纤维、已固定有抗卵黄磷蛋白抗体的 NC 膜及硬质吸水滤纸按图装配，配件与塑料底板的结合可用双面胶或其它粘性材料粘接。装配好的纸板按纵向剪切，裁成宽度为 4mm 的条状，将试纸条密封入铝箔袋或装入塑料外壳后再密封，即为检测雌雄用纸条。

⑥结果判断：出现两条粉红色条 C 和 T 带的为雌鱼，出现一条 C 带的为雄鱼。

专利名称(译)	鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN1763090A	公开(公告)日	2006-04-26
申请号	CN200510010421.3	申请日	2005-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黑龙江水产研究所		
申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黑龙江水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黑龙江水产研究所		
[标]发明人	张颖 孙大江 曲秋芝 刘海金		
发明人	张颖 孙大江 曲秋芝 刘海金		
IPC分类号	C07K14/435 G01N33/53		
代理人(译)	单军		
其他公开文献	CN100404553C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

鲟科鱼类卵黄磷蛋白的制备方法及其应用，它涉及用于鉴别鲟科鱼类雌雄的卵黄磷蛋白的制备方法及通过使用卵黄磷蛋白鉴别鲟科鱼类雌雄的方法。鉴于国内还没有建立使用鲟科鱼类卵黄磷蛋白来检测鲟科鱼类卵黄蛋白原的免疫学方法，国外只建立少数鲟科鱼类的酶联免疫法，本发明按照下述步骤进行制备：一、取鲟科鱼类的卵，低温高速匀浆和低温离心后，经饱和硫酸铵沉淀，凝胶柱分离纯化，透析除盐后，制备卵黄磷蛋白冻干粉；二、称取冻干粉，溶于生理盐水中，加入弗氏佐剂乳化，免疫大白兔，制备多克隆抗体，它可以用于鉴别鲟科鱼类雌雄。本发明具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、成本低等优点。