



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107367617 A

(43)申请公布日 2017. 11. 21

(21)申请号 201710519461.3

(22)申请日 2017.06.30

(71)申请人 大连理工大学

地址 124221 辽宁省盘锦市辽东湾新区大  
工路2号

(72)发明人 宫玉峰 易先亮 钟熙 张绍帅

(74)专利代理机构 大连理工大学专利中心  
21200

代理人 李晓亮 潘迅

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/74(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

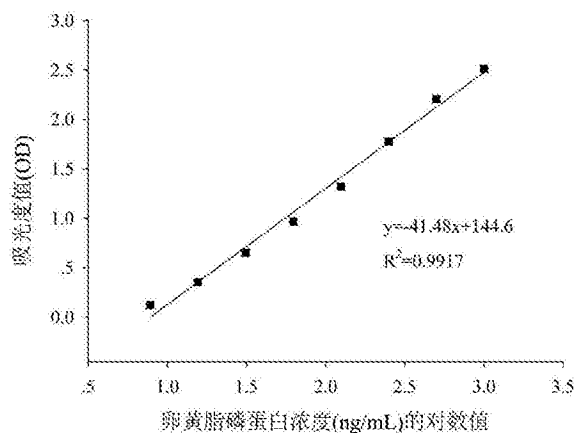
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

一种改良的定量检测海水青鲮鱼卵黄原蛋白的试剂盒、制备方法及应用

## (57)摘要

本发明为一种改良的定量检测海水青鲮鱼卵黄原蛋白的试剂盒、制备方法及应用,属于环境监测领域。试剂盒中包括1块空白96孔酶标板、1支海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品、1支兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体、1支辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体、包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1支。通过“凝胶过滤层析+离子交换层析”两步法分离纯化了海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白,获得的卵黄脂磷蛋白与卵黄原蛋白具有相同的免疫原性,作为检测卵黄原蛋白的标准品,且热稳定性更佳。本试剂盒可以快速、灵敏的定量检测海水青鲮鱼样本中的卵黄原蛋白,能够为海洋环境雌激素污染的生物监测提供技术手段。



1. 一种改良的定量检测海水青鲮鱼卵黄原蛋白的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包括1个箱体,盒体内装有1块空白96孔酶标板;1支海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品,使用前用样品稀释液稀释至所需浓度;1支兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体,使用前用包被液稀释至 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ;1支辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体,使用前用样品稀释液按1:2500的比例稀释;包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1支;

所述的包被液为碳酸盐缓冲液;封闭液、样品稀释液、洗涤液为磷酸盐缓冲液;显色液为单组分显色液;终止液为 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液。

2. 根据权利要求1所述的一种改良的定量检测海水青鲮鱼卵黄原蛋白的试剂盒,其特征在于,所述的包被液为50mM的碳酸盐缓冲液,pH 9.6;所述的封闭液为含2%BSA的磷酸盐缓冲液,pH 7.4;所述的样品稀释液为含0.05%Tween-20及1%BSA的磷酸盐缓冲液;所述的洗涤液为含0.05%Tween-20的150mM的磷酸盐缓冲液,pH 7.4;所述的显色液为TMB单组分显色液;所述的终止液为2M的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液。

3. 权利要求1或2所述的试剂盒的制备方法,其特征在于制备盒体内的海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品、兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体,包括以下步骤:

所述的海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品的制备方法,包括以下步骤:

1) 取卵黄形成后期的雌性海水青鲮鱼卵巢组织,去除结缔组织,收集鱼卵;加入鱼卵3~4倍体积、4℃预冷的匀浆缓冲液,4℃机器匀浆后,10000rpm/min离心20分钟,收集上清液;所述的匀浆缓冲液为25mM氨基丁三醇Tris,内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶,并用HCl或NaOH调整pH值为7.6;

2) 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℃下,以8000rpm/min离心10分钟,弃去上清液,将沉淀重新溶解于25mM Tris-HCl缓冲液中,获得卵匀浆提取液;

3) 取1mL卵匀浆提取液加入至层析柱,用含0.07M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液洗脱;收集含有海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白的洗脱峰进行离子交换层析,分别用含0.07M、0.1M、0.2M、0.3M和1.0M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液进行不连续洗脱,收集0.2M洗脱组分,即为海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品;

所述的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体的制备方法,包括以下步骤:

1) 采用水体暴露 $17\beta$ -雌二醇的方法诱导海水青鲮鱼合成卵黄原蛋白,其中, $17\beta$ -雌二醇的暴露浓度为50~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ;

2) 取暴露后的海水青鲮鱼,称重,并加入海水青鲮鱼3倍质量的匀浆缓冲液,冰浴匀浆,匀浆液低温离心后收集上清液;

3) 将收集到的上清液用凝胶过滤层析,用25mM Tris-HCl匀浆缓冲液冲流洗脱层析柱,收集主洗脱峰得到洗脱液,其中,25mM Tris-HCl匀浆缓冲液内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.6;再将洗脱液加入阴离子交换层析柱,分别用含有0.07、0.1、0.2和1M NaCl的25mM Tris-HCl匀浆缓冲液继续冲流洗脱层析柱,每个梯度冲洗60min,收集0.2M洗脱峰,获得海水青鲮鱼卵黄原蛋白,其中,25mM Tris-HCl匀浆缓冲液内含0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.5;

4) 取海水青鲮鱼卵黄原蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化后制成免疫试剂,

对白兔进行皮下多点注射,每点注射量0.1mL;每隔两周加强免疫1次,单次免疫试剂的剂量为600 $\mu$ g,并使用弗氏不完全佐剂充分乳化后进行皮下多点注射,连续加强免疫5次;第5次免疫后5天心脏采血,6000r/min离心20分钟,收集血浆,获得兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清;向抗血清中加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C震荡2小时后离心,弃去上清液,沉淀用10mL PBS缓冲液溶解;获得的溶液过滤后加入亲和层析柱中,以PBS缓冲液洗脱后,用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱,获得兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体;

所述的辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体的制备方法,包括以下步骤:

称取6mg辣根过氧化物酶溶解于2mL去离子水中,加入0.4mL浓度为0.1M的NaIO<sub>4</sub>溶液,室温、避光条件下搅拌后,将溶液装入透析袋中,用1mM pH4.4的醋酸钠缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;向其中加入0.5mL 0.16M的乙二醇水溶液,室温放置后加入3mg兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体,并混合均匀,装入透析袋中,用0.05M pH 9.5的碳酸盐缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;向其中加入0.1mL 5mg/mL的NaBH<sub>4</sub>溶液,混合均匀后4 $^{\circ}$ C放置;缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清液,利用0.15M pH 7.4的PBS缓冲液溶解沉淀;装入透析袋中,用PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;3000r/min离心获取上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品的制备方法中所述的步骤2)和步骤3) Tris-HCl缓冲液中含有0.07M NaCl, pH 7.5。

5. 根据权利要求3或4所述的试剂盒的制备方法,其特征在于,兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体的制备方法所述的步骤3) 匀浆缓冲液冲流洗脱层析柱的流速为1mL/min。

6. 权利要求1或2所述的试剂盒用于进行海洋环境雌激素污染检测,其特征在于以下步骤:

(1) 采用盒体中的包被液将兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体稀释至5 $\mu$ g/mL,向96孔酶标板的各孔中加入100 $\mu$ L该溶液,4 $^{\circ}$ C包被8-12小时,弃去孔内溶液,采用洗涤液洗涤;

(2) 向96孔酶标板中加入封闭液300 $\mu$ L,室温下封闭1小时,弃去孔内溶液,采用洗涤液洗涤;

(3) 利用样品稀释液将海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品稀释为3.9、7.8、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1000及2000ng/mL的浓度梯度,按100 $\mu$ L/孔的量将不同浓度梯度的海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品和待测样品分别加入96孔酶标板不同的孔中,37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,弃去孔内溶液,采用洗涤液洗涤;所述的待测样品为海水,稀释至标准曲线的浓度范围之内;

(4) 采用盒体中的样品稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体稀释2500倍,每孔加入该稀释抗体100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C下孵育1小时;

(5) 每孔加入100 $\mu$ L显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应10分钟;

(6) 反应结束后,每孔加入50 $\mu$ L终止液,并用酶标仪测定450nm波长下各孔的吸光值,测定需在反应终止后15分钟内完成;

(7) 计算:以标准品浓度的对数值为横坐标,吸光值为纵坐标作标准曲线,计算标准曲线的回归方程式,将待测样品的吸光值代入方程式,计算待测样品浓度,再乘以稀释倍数,即为待测样品中海水青鲮鱼卵黄原蛋白的实际浓度。

## 一种改良的定量检测海水青鳉鱼卵黄原蛋白的试剂盒、制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于环境监测领域,涉及一种改良的定量检测海水青鳉鱼卵黄原蛋白的试剂盒,具有更佳的检测重复性和精确度,适于海洋环境雌激素污染的生物监测。

### 背景技术

[0002] 环境雌激素是一类种类多样的外源化合物,能够扰乱生物体正常的激素水平,损害内分泌系统功能,并进一步影响野生动物的繁殖过程、种群性别比例及规模。近年来,海洋环境雌激素污染问题引起了越来越多的关注。

[0003] 卵黄原蛋白(Vitellogenin,Vtg)是卵生动物卵黄蛋白的前体,在 $17\beta$ -雌二醇的刺激下,由肝脏合成与分泌,通过血液循环转运至卵巢,作为胚胎发育的营养源。通常情况下,Vtg由卵黄生成期的雌鱼大量合成,而雄鱼与幼鱼因内源雌激素水平较低而不能合成或合成量很低。但雄鱼与幼鱼同样具有Vtg基因,在外源雌激素的作用下,也可被诱导合成Vtg。因此,雄鱼或幼鱼的Vtg水平是指示环境雌激素污染的理想指标。

[0004] 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)因具有检测灵敏度高、操作简便、快速的优点,已被广泛用于Vtg的检测。目前,已建立Vtg ELISA检测方法的鱼类多为淡水鱼,包括斑马鱼(Danio rerio)、黑头呆鱼(Pimephales promelas)、鲤鱼(Cyprinus carpio)及稀有鮡鲫(Gobiocypris rarus)等。海水青鳉鱼(Oryzias melastigma)具有体型小、易于饲养、世代周期短、盐度适应范围广,并且对环境污染反应敏感的特点,是理想的海洋环境监测模式生物。

[0005] 研究发现鱼类Vtg,特别是海洋鱼种Vtg,即使在低温条件下保存也极易发生降解,并且降解后的Vtg蛋白片段会增加其免疫原性,从而导致ELISA实验中标准曲线的异常变化,影响ELISA检测结果的稳定性。而Vtg降解也被认为是导致ELISA精确度较低的重要原因。卵黄脂磷蛋白(Lipovitellin,Lv)是Vtg在卵巢中的裂解产物,与Vtg具有相似的免疫原性,并且具有极高的热稳定性。因此,利用Lv作为ELISA检测实验中的抗原(标准品)将大大增加Vtg检测的稳定性和精确度。然而,目前尚未有研究利用Lv为抗原(标准品)开发建立海水青鳉鱼Vtg ELISA检测技术,制约了海水青鳉鱼在海洋环境雌激素污染监测中的应用。

[0006] 因此,纯化制备高纯度的海水青鳉鱼Lv,建立以Lv为标准品的海水青鳉鱼Vtg ELISA定量检测方法,改进现有方法的稳定性及精确度,具有重要的实际意义。

### 发明内容

[0007] 本发明提供了一种改良的定量检测海水青鳉鱼(Oryzias melastigma)卵黄原蛋白的试剂盒,该试剂盒以海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白为抗原标准品,能够极大提高现有检测方法的稳定性和精确度。该方法的检测范围为 $7.8\sim 1000\text{ng/mL}$  ( $R^2>0.990$ ),检出限可以达到 $3.1\text{ng/mL}$ ,组间与组内变异系数分别小于 $3.85\%$ 及 $4.83\%$ 。

[0008] 本发明的技术方案为:

[0009] 一种改良的定量检测海水青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 卵黄原蛋白的试剂盒, 该试剂盒包括1个箱体, 盒体内装有1块空白96孔酶标板; 1支海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品, 使用前用样品稀释液稀释到所需浓度; 1支兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体, 使用前用包被液稀释至5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 1支辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体, 使用前用样品稀释液按1:的比例稀释; 包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1支。

[0010] 所述的包被液为50mM pH 9.6碳酸盐缓冲液; 所述的封闭液为含2%BSA的pH 7.4的磷酸盐缓冲液; 所述的样品稀释液为含0.05%Tween-20及1%BSA的磷酸盐缓冲液; 所述的洗涤液为含0.05%Tween-20的150mM pH 7.4的磷酸盐缓冲液; 所述的显色液为TMB单组分显色液; 所述的终止液为2M的 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液。

[0011] 上述试剂盒的制备方法, 主要是制备盒体内的海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品、兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体, 包括以下步骤:

[0012] 所述的海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品的制备方法, 包括以下步骤:

[0013] 1) 取卵黄形成后期的雌性海水青鳉鱼卵巢组织, 去除结缔组织, 收集鱼卵; 加入鱼卵3~4倍体积、4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的匀浆缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 机器匀浆后, 10000rpm/min离心20分钟, 收集上清液。所述的匀浆缓冲液为25mM氨基丁三醇(Tris), 内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶, 并用HCl或NaOH调整pH值为7.6。

[0014] 2) 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 $^{\circ}\text{C}$ 下, 以8000rpm/min离心10分钟, 弃去上清, 将沉淀重新溶解于25mM Tris-HCl, 获得卵匀浆提取液; 所述的Tris-HCl中含有0.07M NaCl, pH 7.5。

[0015] 3) 取1mL卵匀浆提取液加入至Sephacryl S-300层析柱, 用含0.07M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液洗脱; 收集含有海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白的洗脱峰进行离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow), 分别用含0.07M、0.1M、0.2M、0.3M和1.0M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液进行不连续洗脱, 收集0.2M洗脱组分, 即为海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品。所述的Tris-HCl缓冲液pH为7.5。

[0016] 所述的兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体制备方法, 包括以下步骤:

[0017] 1) 采用水体暴露17 $\beta$ -雌二醇的方法诱导海水青鳉鱼合成卵黄原蛋白, 其中, 17 $\beta$ -雌二醇的暴露浓度为50~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[0018] 在自然光照、水温20~25 $^{\circ}\text{C}$ 、17 $\beta$ -雌二醇暴露浓度为50~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的条件下, 对海水青鳉鱼进行暴露处理。

[0019] 2) 取暴露10天后的海水青鳉鱼, 称重, 加入是海水青鳉鱼3倍质量的冰冷匀浆缓冲液, 冰浴匀浆, 匀浆液低温离心10分钟, 收集上清液。所述的匀浆缓冲液为25mM Tris, 内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶, pH 7.6。

[0020] 3) 将收集到的上清液用凝胶过滤层析(Sephacryl S-300), 用25mM Tri-HCl缓冲液以1mL/min的流速冲流层析柱, 收集主洗脱峰, 其中, 25mM Tri-HCl缓冲液内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶, pH 7.6。再将洗脱液加入DEAE-Sepharose阴离子交换层析柱, 用分别含有0.07、0.1、0.2和1M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液继续以1mL/min的流速洗脱, 每个梯度冲洗60min, 收集0.2M洗脱峰, 获得海水青鳉鱼卵黄原蛋白, 其中25mM Tris-HCl缓冲

液内含0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.5。

[0021] 4) 取纯化的海水青鲮鱼卵黄原蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化后制成免疫试剂,对雄性、健康新西兰大白兔进行皮下多点注射,每点注射量0.1mL;随后,每隔两周加强免疫1次,单次免疫试剂的剂量为600 $\mu$ g,并使用弗氏不完全佐剂充分乳化后进行皮下多点注射,共连续加强免疫5次;第5次免疫后5天心脏采血,6000r/min离心20分钟,收集血浆,获得兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清;向抗血清中加入等体积的冰冷饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C震荡2小时后离心,弃去上清液,沉淀用10mL PBS缓冲液溶解;获得的溶液使用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,随后加入到亲和层析柱中,以PBS缓冲液洗脱10倍柱体积后,用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱,即获得兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体。

[0022] 所述的辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0023] 称取6mg辣根过氧化物酶溶解于2mL去离子水中,加入0.4mL新鲜配置的0.1M的NaI<sub>04</sub>溶液,室温避光条件下磁力搅拌20分钟;将获得的溶液装入透析袋中,对1mM pH 4.4的醋酸钠缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;随后,向其中加入0.5mL 0.16M的乙二醇水溶液,室温放置30分钟;加入3mg兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体,并混合均匀,装入透析袋中,对0.05M pH 9.5的碳酸盐缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;向其中加入0.1mL 5mg/mL的NaBH<sub>4</sub>溶液,混合均匀后4 $^{\circ}$ C放置2小时;缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清液,利用0.15M pH 7.4的PBS缓冲液溶解沉淀;装入透析袋中,对PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析8-12小时;3000r/min离心获取上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体。

[0024] 应用上述试剂盒进行海洋环境雌激素污染检测,包括以下步骤:

[0025] (1) 采用盒体中的包被液将兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体稀释至5 $\mu$ g/mL,向96孔酶标板的各孔中加入100 $\mu$ L该溶液,4 $^{\circ}$ C包被8-12小时,弃去孔内溶液,使用洗涤液洗涤5次。

[0026] (2) 向96孔酶标板中加入封闭液300 $\mu$ L,室温下封闭1小时,弃去孔内溶液,使用洗涤液洗涤5次。

[0027] (3) 利用样品稀释液将海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品稀释为3.9、7.8、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1000及2000ng/mL的浓度梯度,按100 $\mu$ L/孔的量将不同浓度梯度的海水青鲮鱼卵黄脂磷蛋白标准品和待测样品分别加入96孔酶标板不同的孔中,37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,弃去孔内溶液,使用洗涤液洗涤5次;所述的待测样品为海水,稀释至标准曲线的浓度范围之内。

[0028] (4) 采用盒体中的样品稀释液将辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲮鱼卵黄原蛋白抗体稀释倍,每孔加入该稀释抗体100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C下孵育1小时。

[0029] (5) 每孔加入100 $\mu$ L显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应10分钟。

[0030] (6) 反应结束后,每孔加入50 $\mu$ L终止液,并用酶标仪测定450nm波长下各孔的吸光值,测定需在反应终止后15分钟内完成;

[0031] (7) 计算:以标准品浓度的对数值为横坐标,吸光值为纵坐标作标准曲线,计算标准曲线的回归方程式,将待测样品的吸光值代入方程式,计算待测样品浓度,再乘以稀释倍数,即为待测样品中海水青鲮鱼卵黄原蛋白的实际浓度。

[0032] 本发明的有益效果如下:本试剂盒通过“凝胶过滤层析+离子交换层析”两步法分离纯化海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白,获得的卵黄脂磷蛋白与卵黄原蛋白具有相同的免疫原性,将海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白作为检测卵黄原蛋白的标准品,且热稳定性更佳。本试剂盒可以快速、灵敏的定量检测海水青鳉鱼样本中的卵黄原蛋白,能够为海洋环境雌激素污染的生物监测提供技术手段。相比已有方法,本试剂盒的优势在于具有更好的检测结果重现性和精确度。该方法的检测范围为7.8~1000ng/mL ( $R^2>0.990$ ),检出限可以达到3.1ng/mL,组间与组内变异系数分别小于3.85%及4.83%。

## 附图说明

[0033] 图1为本发明的试剂盒对海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品的检测结果。

## 具体实施方式

[0034] 以下对本发明做进一步说明。

[0035] 一种改良的定量检测海水青鳉鱼 (*Oryzias melastigma*) 卵黄原蛋白的试剂盒,包括1个盒体,盒体内装有:(1) 96孔酶标板1块;(2) 兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体1支;(3) 辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体1支;(4) 包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1支。其特征在于该试剂盒还装有(5) 海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品1支。

[0036] 制备该试剂盒包括以下步骤:

[0037] (1) 制备海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品;

[0038] (2) 制备兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体;

[0039] (3) 制备辣根过氧化物酶标记的海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体;

[0040] 其中,所述(1) 制备海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品方法如下:

[0041] 取卵黄形成后期的雌性海水青鳉鱼卵巢组织,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(25mM Tris,内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.6)混合,4℃机器匀浆后,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℃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,pH 7.5),获得卵匀浆提取液;取1mL卵匀浆提取液加入至Sephacryl S-300层析柱,用含0.07M NaCl的25mM Tris-HCl(pH 7.5)洗脱;收集含有海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白的洗脱峰进行离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow),分别用含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洗脱组分,即为海水青鳉鱼卵黄脂磷蛋白标准品。

[0042] 所述(2) 制备兔抗海水青鳉鱼卵黄原蛋白抗体方法如下:

[0043] 采用水体暴露17 $\beta$ -雌二醇的方法诱导海水青鳉鱼合成卵黄原蛋白。将海水青鳉鱼成鱼置于5L的玻璃水族箱中,每个玻璃水族箱中放入10尾海水青鳉鱼;17 $\beta$ -雌二醇的暴露浓度为100 $\mu\text{g/L}$ ,每天全部换水,并重新加入相应量的17 $\beta$ -雌二醇,以保持暴露浓度不变;早晚饲喂饵料,保持水温25℃,自然光照;暴露10天后将斑马鱼放入50%的酒精中麻醉处死,称重,并加入3倍体积冰冷的匀浆缓冲液(25mM Tris,内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.6),冰浴匀浆,匀浆液低温离心10分钟,收集上清液;将收集到的上清液用于凝胶过滤

层析(Sephacryl S-300),用25mM Tris-HCl缓冲液(内含0.07M NaCl和0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.6)以1mL/min的流速冲流层析柱,收集主洗脱峰;再将洗脱液加入DEAE-Sepharose阴离子交换层析柱,用分别含有0.07、0.1、0.2和1M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液(内含0.5TIU/mL抑肽酶,pH 7.5)继续以1mL/min的流速洗脱,每个梯度冲洗60min,收集0.2M洗脱峰,获得海水青鲱鱼卵黄原蛋白。

[0044] 取800 $\mu$ g纯化的海水青鲱鱼卵黄原蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化后对雄性、健康新西兰大白兔进行皮下多点注射,每点注射量0.1mL;随后,每隔两周加强免疫1次,单次免疫剂量为600 $\mu$ g,并使用弗氏不完全佐剂充分乳化后进行皮下多点注射,共连续加强免疫5次;第5次免疫后5天心脏采血,6000r/min离心20分钟,收集血浆,获得兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清;向抗血清中加入等体积的冰冷饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C震荡2小时后离心,弃去上清液,沉淀用10mL PBS缓冲液溶解;获得的溶液使用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,随后加入到Hitrap Protein G亲和层析柱中,以PBS缓冲液洗脱10倍柱体积后,用pH 2.7的0.1M甘氨酸洗脱,即获得兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体。

[0045] 所述(3)制备辣根过氧化物酶标记的海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体方法如下:

[0046] 称取6mg辣根过氧化物酶溶解于2mL去离子水中,加入0.4mL新鲜配置的0.1M的NaIO<sub>4</sub>溶液,室温避光条件下磁力搅拌20分钟;将获得的溶液装入透析袋中,对1mM pH 4.4的醋酸钠缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析12小时;随后,向其中加入0.5mL 0.16M的乙二醇水溶液,室温放置30分钟;加入3mg权利要求1所述的兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体,并混合均匀,装入透析袋中,对0.05M pH 9.5的碳酸盐缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析12小时;向其中加入0.1mL 5mg/mL的NaBH<sub>4</sub>溶液,混合均匀后4 $^{\circ}$ C放置2小时;缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4 $^{\circ}$ C离心后弃去上清液,利用0.15M pH 7.4的PBS缓冲液溶解沉淀;装入透析袋中,对PBS缓冲液4 $^{\circ}$ C避光透析12小时;3000r/min离心获取上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体。

[0047] 最后,将制备的海水青鲱鱼卵黄脂磷蛋白标准品1支、兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体1支、辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体1支、空白96孔酶标版1块,以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1瓶装入盒体内,构成本发明的试剂盒。

[0048] 其具体组成如下:

[0049] (1) 空白96孔酶标版1块;

[0050] (2) 海水青鲱鱼卵黄脂磷蛋白标准品1支,使用前用样品稀释液稀释到所需浓度;

[0051] (3) 兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体1支,使用前用包被液稀释至5 $\mu$ g/mL;

[0052] (4) 辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲱鱼卵黄原蛋白抗体1支,使用前用样品稀释液按1:4000的比例稀释;

[0053] (5) 包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1瓶,所述的包被液为50mM pH 9.6碳酸盐缓冲液:1.59g NaCO<sub>3</sub>及2.93g NaHCO<sub>3</sub>溶于1L蒸馏水中;洗涤液为含0.05%Tween-20的150mM pH 7.4的磷酸盐缓冲液:8.0g NaCl,0.2g KCl,2.9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,0.2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>及0.5mL Tween-20溶于1L蒸馏水中;封闭液为含2%BSA的pH 7.4的磷酸盐缓冲液:0.2g BSA溶于10mL pH 7.4的磷酸盐缓冲液中;样品稀释液为含0.05%Tween-20及1%BSA的磷酸盐缓冲液:0.1g BSA溶于10mL封闭液;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;终止液为2M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液。

[0054] 本试剂盒可以用于海洋环境雌激素污染的监测,使用时分为以下步骤:

[0055] (1) 使用盒体中的包被液稀释兔抗海水青鲷鱼卵黄原蛋白抗体至5μg/mL,向96孔板各孔中加入该溶液100μL,4℃包被过夜,弃去孔内溶液,使用洗涤液洗涤5次;

[0056] (2) 向96孔板中加入封闭液300μL,室温下封闭1小时,弃去孔内溶液,使用洗涤液洗涤5次;

[0057] (3) 利用样品稀释液将海水青鲷鱼卵黄脂磷蛋白标准品稀释为3.9、7.8、15.62、31.25、62.5、125、250、500、1000及2000ng/mL的浓度梯度,将不同浓度梯度的海水青鲷鱼卵黄脂磷蛋白标准品和待测样品分别加入96孔酶标板不同的孔中,37℃下孵育1小时,弃去孔内溶液,采用洗涤液洗涤;所述的待测样品为海水,稀释至标准曲线的浓度范围之内。

[0058] (4) 使用样品稀释液1:4000倍稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲷鱼卵黄原蛋白抗体,每孔加入该稀释抗体100μL,37℃下孵育1小时;

[0059] (5) 每孔加入100μL显色液,37℃避光反应10分钟;

[0060] (6) 反应结束后,每孔加入50μL终止液,并用酶标仪测定450nm波长下各孔的吸光值,测定需在反应终止后15分钟内完成;

[0061] (7) 计算:以标准品浓度的对数值为横坐标,吸光值为纵坐标作标准曲线,计算标准曲线的回归方程式,将样品的吸光值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品中海水青鲷鱼卵黄原蛋白的实际浓度。此卵黄原蛋白的实际浓度可以反映海水中雌激素的污染状况,在环境监测领域应用广泛。

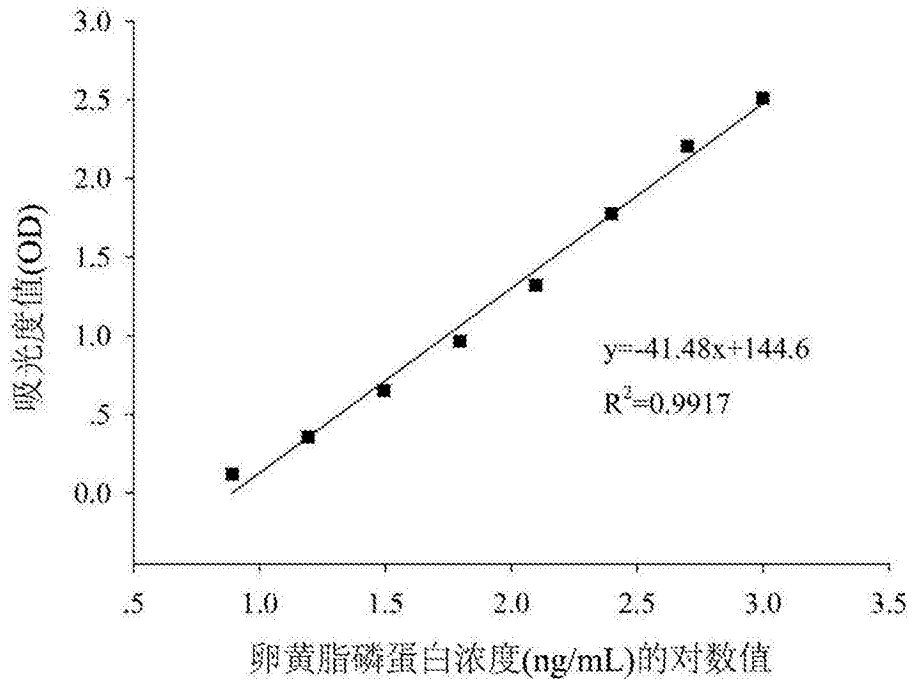


图1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种改良的定量检测海水青鲈鱼卵黄原蛋白的试剂盒、制备方法及应用                |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107367617A</a>                   | 公开(公告)日 | 2017-11-21 |
| 申请号            | CN201710519461.3                               | 申请日     | 2017-06-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 大连理工大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 大连理工大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 大连理工大学   |         |            |
| [标]发明人         | 宫玉峰<br>易先亮<br>钟熙<br>张绍帅                        |         |            |
| 发明人            | 宫玉峰<br>易先亮<br>钟熙<br>张绍帅                        |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/74 G01N33/531                 |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/68 G01N33/531 G01N33/74                 |         |            |
| 代理人(译)         | 李晓亮<br>潘迅                                      |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明为一种改良的定量检测海水青鲈鱼卵黄原蛋白的试剂盒、制备方法及应用，属于环境监测领域。试剂盒中包括1块空白96孔酶标板、1支海水青鲈鱼卵黄脂磷蛋白标准品、1支兔抗海水青鲈鱼卵黄原蛋白抗体、1支辣根过氧化物酶标记的兔抗海水青鲈鱼卵黄原蛋白抗体、包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液及终止液各1支。通过“凝胶过滤层析+离子交换层析”两步法分离纯化了海水青鲈鱼卵黄脂磷蛋白，获得的卵黄脂磷蛋白与卵黄原蛋白具有相同的免疫原性，作为检测卵黄原蛋白的标准品，且热稳定性更佳。本试剂盒可以快速、灵敏的定量检测海水青鲈鱼样本中的卵黄原蛋白，能够为海洋环境雌激素污染的生物监测提供技术手段。

