

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/74



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02138914.4

[45] 授权公告日 2004 年 10 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1170161C

[22] 申请日 2002.8.12 [21] 申请号 02138914.4

[71] 专利权人 中国科学院水生生物研究所
地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 徐 盈 梁 勇
审查员 倪晓红

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法，首先是卵黄蛋白原的诱导和分离纯化，鱼体腹腔注射乙炔基雌二醇，用离子交换柱分离纯化鱼血清，透析脱盐，制备其冻干粉；其次是卵黄蛋白原多克隆抗体的制备，溶解冻干粉，加入弗氏佐剂乳化，免疫大白兔，制备多克隆抗体；第三是生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体的制备，亲和柱分离纯化抗体，加入生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯反应，在 PBS 缓冲液中透析，加入甘油，冻存。本发明可灵敏、准确、方便的定量检测多种鲤科鱼类血液中、肝组织、肝细胞培养基及鱼体中的卵黄蛋白原。

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

1、类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法，包括下列步骤：

A、卵黄蛋白原标准样品的诱导和分离纯化：

①配制 17α -乙炔基雌二醇溶液，将 100mg 17α -乙炔基雌二醇先溶于 5mL 丙酮，再转溶于 10mL 豆油中，丙酮用氮气吹干；

②腹腔注射入鱼体，剂量为 5mg/kg，暴露 5-7 天，取鱼血，4℃ 离心获得血清；

③血清通过离子交换层析柱，填料为二乙基氨基乙基交联琼脂糖 CL-6B，层析柱用 0.025mol/L Tris-HCl，pH7.5 缓冲液平衡，加入 2mL 血清样品，用含 NaCl 的 0.025mol/L Tris-HCl，pH7.5 缓冲液进行梯度洗脱；

④收集含卵黄蛋白原蛋白的洗脱液，透析脱盐后，冷冻干燥为冻干粉；

B、卵黄蛋白原多克隆抗体的制备：

①称取 1mg 卵黄蛋白原的蛋白冻干粉，溶于 1mL 双蒸水中，加入 1mL 弗氏完全佐剂，乳化后，在大白兔背部皮内注射，进行初次免疫；

②第 28、42、56 天各加强免疫一次，免疫剂量同第一次，采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液，并在大白兔背部皮下注射，加强免疫；

③65 天后，从兔耳缘静脉抽取少量血液测量抗体的滴度；

④从兔颈动脉放血，制备卵黄蛋白原的抗血清；

C、生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体的制备

①用蛋白质 A 交联琼脂糖 CL-4B 亲和交换柱分离纯化兔血清中的 IgG，透析、冻干；

②称取 1mg 卵黄蛋白原多克隆抗体冻干粉，溶于 1ml 0.1mol/L NaHCO_3 中，加入 20 μL 生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯，混合后，室温反应 2 小时；

③再于磷酸盐缓冲液中透析 24 小时，加入甘油，混合后，-20℃ 冻存。

类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法

技术领域

本发明涉及类雌激素的生态安全及风险性评价研究，特别是涉及一种结合了生物素-亲和素酶联免疫吸附原理定量检测鲤科鱼类血液中、鱼肝组织中、鱼肝细胞培养基以及鱼体中卵黄蛋白原（Vitellogenin, VTG）含量的类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法。

背景技术

内分泌干扰物，即那些可干扰维持体内内分泌平衡，调节生长发育的内源激素的产生、分泌、运输、代谢及作用的外源化合物。它们可干扰生物体内分泌系统的功能，从而影响生物体的生长、发育和繁殖。人类每年都会合成许多新的化合物，而它们在给人们的生活带来方便的同时，对环境及人体健康同样会造成各种潜在的危害。这些内分泌干扰物不断释放进入水环境中，已经影响了鱼类、爬行类、鸟类等多种水生生物种群的繁衍及生存质量，而且会随之干扰整个水生态系统的平衡与稳定，从而给人类社会带来多种直接和间接的危害。我国目前的水污染情况非常严重，大量的城市生活污水和工业废水在未经过任何处理或者仅仅少部分经过简单的处理后便排放到环境中去，目前不但已经污染了人类赖以生存的水源，将来必然还会给我国的可持续性发展造成影响。所以目前迫切需要建立能够筛选和鉴定环境中已经大量存在的以及人们不断新合成的物质是否具有内分泌干扰效应的方法，并借助这些方法对其生态安全性进行正确的评价。

卵黄蛋白原是具有种特异性的高分子量磷脂蛋白。卵黄生成期间的雌鱼分泌雌激素，诱导肝细胞生成卵黄蛋白原，卵黄蛋白原通过血液循环系统，运输到卵巢，在经过修饰后，成为鱼卵生长发育的营养物质—卵黄蛋白。雌鱼在卵黄生成期可生成大量卵黄蛋白原，但在雌鱼的其它生活期间，鱼体内的卵黄蛋白原的含

量却很低。雄鱼和幼鱼在大剂量的人工雌激素作用下,以及在低剂量的类雌激素长期作用下,都能诱导体内卵黄蛋白原的生成。另外,某些内分泌干扰物具有抗雌激素的作用,其干扰雌鱼体内卵黄蛋白原的生成,使雌鱼血液中卵黄蛋白原的含量比正常时低。因而雄鱼和幼鱼及非卵黄生成期的雌鱼体内卵黄蛋白原生成水平的变化可作为环境中类雌激素污染存在的生物标志物。

目前国外也建立了几种硬骨鱼类卵黄蛋白原的酶联免疫吸附检测试剂盒和放射性免疫检测试剂盒,但试剂盒所能检测的鱼类在中国的分布很少或没有,不具有代表性,而且试剂盒的价格极其昂贵,难以推广。

发明内容

本发明的目的在于提供类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法,采用该方法制备的试剂盒可灵敏、准确、方便的定量检测多种鲤科鱼类血液中、肝组织中、鱼肝细胞培养基以及鱼体中卵黄蛋白原的含量。

为了达到上述目的,本发明采用以下技术方案:本发明基于生物素一亲和素与双抗夹心酶联免疫吸附分析相结合的检测原理,即先将捕获抗体非特异吸附在酶标板上,封闭多余的吸附位点,加入样品,待其结合后,加入生物素标记的抗体与之结合,除去多余的未结合生物素标记的抗体,再加入酶标记的亲和素结合一段时间,然后除去未结合的酶标记亲和素,最后加入底物开始酶促反应,并测定溶液的吸收强度,而吸收强度与检测样品中卵黄蛋白原的含量呈正相关。同时用标准蛋白溶液同步对比操作拟合标准曲线,检测样品可根据其吸收强度在标准曲线上计算出卵黄蛋白原的相应浓度。

本发明与现有技术相比,具有以下优点和效果:检测试剂盒在双抗夹心酶联免疫吸附检测的基础上,加入了生物素一亲和素反应体系,从而可以更加灵敏、准确、方便的检测多种鲤科鱼类体内的卵黄蛋白原;其最低检测限为 1ng/ml,线性工作范围为 5ng/ml — 150ng/ml,为类雌激素的筛选、鉴定和风险性评价工作提供了一个可靠的研究手段。

具体实施方式

其步骤如下:

(1) 本发明所用的卵黄蛋白原标准样品的诱导和分离纯化

配制 17 α -乙炔基雌二醇 (17 α -ethinylestradiol, EE₂) 溶液: 将 100mg 17 α -乙炔基雌二醇先溶于 5mL 丙酮, 再转溶于 10mL 豆油中, 丙酮用氮气吹干。腹腔注射入鱼体, 剂量为 5mg/kg, 暴露 5-7 天后, 取鱼血, 4℃ 离心获得血清。血清通过离子交换层析柱, 填料为 DEAE Sepharose CL-6B。层析柱先用 0.025mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液平衡, 然后加入 2mL 血清样品, 用含 NaCl 的 Tris-HCl, (pH 7.5) 缓冲液进行梯度洗脱, 采用部分收集器收集洗脱液, 并以电泳确定各管中是否含有卵黄蛋白原。收集含有卵黄蛋白原蛋白的溶液, 经透析脱盐后, 冷冻干燥为冻干粉。

(2) 卵黄蛋白原多克隆抗体的制备

称取 1mg 卵黄蛋白原的蛋白冻干粉, 溶于 1mL 双蒸水中, 加入 1mL 弗氏完全佐剂, 乳化后, 在新西兰大白兔背部皮内多点注射, 进行初次免疫。第 28、42、56 天各加强免疫一次: 免疫剂量同第一次, 但采用弗氏不完全佐剂乳化抗原溶液, 并在新西兰大白兔背部皮下多点注射, 加强免疫。65 天后, 从兔耳缘静脉抽取少量血液测量抗体的滴度, 如果抗体的效价较低, 可多加强免疫一次。如抗体的效价高, 则从兔颈动脉放血, 制备卵黄蛋白原的抗血清。

(3) 生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体的制备

先用 Protein A Sepharose CL-4B 亲和交换柱分离纯化兔血清中的 IgG, 透析、冻干; 称取 1mg 卵黄蛋白原多克隆抗体冻干粉, 溶于 1mL 0.1 mol/L NaHCO₃ 中, 加入 20 μ L 生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯 (BNHS, 溶于二甲基甲酰胺, 20mg/mL), 混合后, 室温反应 2 小时, 再于 PBS 缓冲液中透析 24 小时, 加入一定量的甘油, 混合后, -20℃ 冻存。

(4) 本发明所制备的试剂盒的具体操作步骤如下:

1. 在 96 孔酶标板每孔中加入 100 μ L 包被液稀释了的卵黄蛋白原多克隆抗体。
2. 4℃ 冰箱中, 包被过夜 (16-24 小时)。
3. 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 (16-24 小时)。

4. 弃去酶标板中的封闭液，每孔加入 300ul 的洗涤液，轻微振荡 1 分钟后，弃去洗涤液，重复 3 次。
5. 每孔加入 100ul 用稀释液稀释的样品、标准品、阴性标准品或试剂空白样品，并于室温孵育 1 小时。
6. 弃去酶标板中的样品，同步骤 4 洗板 4 次。
7. 每孔加入 100ul 用稀释液稀释的生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体，并于室温孵育 1 小时。
8. 弃去酶标板中的生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体，同步骤 4 洗板 4 次。
9. 每孔加入 100ul 用稀释液稀释的酶标记亲和素，室温孵育 10~15 分钟。
10. 弃去酶标板中的酶标记亲和素，同步骤 4 洗板 4 次。
11. 每孔加入 100ul 显色底物，室温暗处反应 10 至 30 分钟，待标准品呈现明显的黄色后，加入 50ul 反应终止液，终止反应。
12. 用酶标仪在 490nm 处检测样品的吸光度。
13. 根据样品的吸收强度在标准曲线上计算出其相应的浓度。

本发明所设计的类雌激素毒性快速检测试剂盒组成如下：

- 1、空白 96 孔高吸附酶标板（1 块）
- 2、标准品：1 支（5ug 左右的卵黄蛋白原冻干粉），使用前用稀释液稀释到所需浓度
- 3、阴性对照标准品：1 支（0.2 ml/支），为不含卵黄蛋白原的鲤鱼血清
- 4、卵黄蛋白原多克隆抗体：1 支（50ul），使用前用包被液稀释 500 倍
- 5、生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体：1 支（20 ul），使用前用稀释液稀释 1000 倍
- 6、酶标记的亲和素：1 支（15ul）使用前用稀释液稀释 1000~2000 倍
- 7、显色液（A）和包被液（B）、稀释液（C）、洗涤缓冲液（D）各一支
- 8、终止液（0.5 mol/L H_2SO_4 ）8ml

注：包被液：0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液，pH 9.5

稀释液：PBS 缓冲液，pH 7.4

洗涤缓冲液：含 0.05% Tween 20 的稀释液

封闭液：含 1%牛血清白蛋白的稀释液

显色液：邻苯二胺（OPD）溶液

专利名称(译)	类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法		
公开(公告)号	CN1170161C	公开(公告)日	2004-10-06
申请号	CN02138914.4	申请日	2002-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院水生生物研究所		
[标]发明人	徐盈 梁勇		
发明人	徐盈 梁勇		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/74		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1395102A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了类雌激素毒性快速检测试剂盒的制备方法，首先是卵黄蛋白原的诱导和分离纯化，鱼体腹腔注射乙炔基雌二醇，用离子交换柱分离纯化鱼血清，透析脱盐，制备其冻干粉；其次是卵黄蛋白原多克隆抗体的制备，溶解冻干粉，加入弗氏佐剂乳化，免疫大白兔，制备多克隆抗体；第三是生物素标记的卵黄蛋白原多克隆抗体的制备，亲和柱分离纯化抗体，加入生物素酰-N-羟基丁二酰亚胺酯反应，在PBS缓冲液中透析，加入甘油，冻存。本发明可灵敏、准确、方便的定量检测多种鲤科鱼类血液中、肝组织、肝细胞培养基及鱼体中的卵黄蛋白原。