



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102768282 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 26

(21) 申请号 201210252420. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 07. 20

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(73) 专利权人 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所

审查员 周洋

地址 430064 湖北省武汉市洪山区南湖大道5号

专利权人 湖北同泰生物工程有限公司

(72) 发明人 廖涛 付云洁 熊光权 徐宏书 王少华 吴文锦 叶敏 李新 耿胜荣 钮晓艳 夏和舟

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 朱盛华

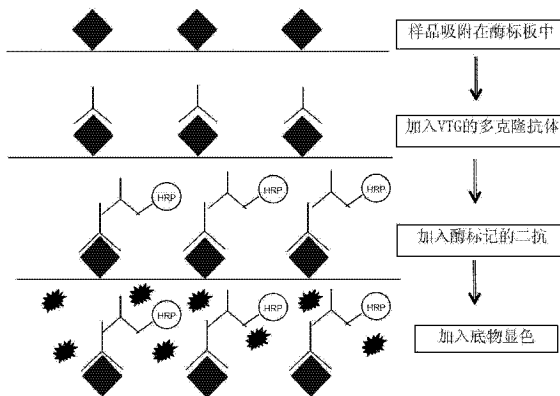
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法,制备方法是,鲢鱼 VTG 的诱导和分离制备纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉;制备特异性的抗 VTG 多克隆抗体,即一抗;将纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉、一抗和酶标记的二抗及酶标板放入试剂盒内,得检测鲢鱼 VTG 试剂盒。测试方法是,用纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉作为标准蛋白并在酶标板中加入稀释的样品溶液;加入一抗到酶标板保温反应;加入酶标记的二抗到酶标板保温反应;加入 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺底物溶液显色反应,用酶标仪测定吸光度值,计算鲢鱼样品中 VTG 的浓度。本发明能快速测试鲢鱼血清、匀浆液等中 VTG 的含量,分析灵敏度高,测试时间短,具有省时、省力的优点,适合于大量样品的分析和筛选。



1. 一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备方法,其特征在于具体步骤如下,

(1) 鲢鱼卵黄蛋白原的诱导和分离纯化:

①配制 100ng/L 的 17 α -乙炔基雌二醇充气水溶液,将 3-4 月龄的鲢鱼幼鱼养殖在配制的水溶液中,暴露 10 天,诱导鲢鱼幼鱼体内产生大量 VTG,断尾采血获得血清;

②血清通过阴离子交换层析柱,所述阴离子交换层析柱填料为 DEAESepharose CL-6B,阴离子交换层析柱用 pH7.5、0.025M Tris-HCl 缓冲液平衡,加入 1mL 血清样品,用含 0.1-0.5M NaCl、pH7.5 的 0.025M Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱,洗脱缓冲液中加入酶抑制剂 PMSF 至终浓度为 2mM,洗脱速度为 1ml/min,每 3 分钟收集一管洗脱组分,透析脱盐后,冷冻干燥制备纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉;

(2) 鲢鱼卵黄蛋白原多克隆抗体的制备:

①大白兔先用弗氏完全佐剂进行预免疫,一周后将 0.5mg/mL 的卵黄蛋白原蛋白液与弗氏完全佐剂按照 1:1 的比例进行初次免疫,两周后将 0.5mg/mL 的卵黄蛋白原蛋白液与弗氏不完全佐剂按照 1:1 的比例进行重复免疫;

② 15 天后,从兔耳缘静脉抽取少量血液测量抗体的效价;若抗体效价高,则从兔颈动脉放血,制备鲢鱼卵黄蛋白原的抗血清,抗血清经辛酸硫酸铵法纯化,透析离心后得到特异性的抗 VTG 多克隆抗体,即一抗,分装保存;

(3) 鲢鱼卵黄蛋白原检测试剂盒制备:将步骤 (1) ②制备的纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉、步骤 (2) ②制备的一抗、酶标记的二抗及酶标板放入试剂盒内,得检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒。

2. 根据权利要求 1 所述的一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备方法,其特征在于将 3-4 月龄的鲢鱼幼鱼 100 条暴露于 100ng/L 的 17 α -乙炔基雌二醇充气水溶液中。

3. 一种用权利要求 1 所述的检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒检测鲢鱼体内 VTG 的方法,其特征在于其步骤如下:

(1) 用权利要求 1 步骤 (1) ②制备的纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉作为标准蛋白,在酶标板中按照 100 μ L/孔量加入 0.025M Tris-HCl 稀释的样品溶液和梯度稀释的 VTG 标准蛋白溶液,制作标准曲线,放入湿盒后 4 $^{\circ}$ C 过夜;

(2) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/孔量加入稀释 1:2000 倍的抗鲢鱼 VTG 多克隆抗体到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温反应 0.5h;

(3) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/孔量加入稀释 1:2000 倍的酶标记的二抗到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温反应 0.5h;

(4) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次,拍干后,按照 100 μ L/孔量加入配制好的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液,37 $^{\circ}$ C 下显色反应 15min 后,按照 50 μ L/孔加入 2M 硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值,根据步骤 (1) 制作的标准曲线来计算鲢鱼样品中 VTG 的浓度。

一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于淡水产品环境分析领域,具体涉及一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法。

背景技术

[0002] 类雌激素是一类具有雌激素活性,能够模拟雌激素功能的环境化学物。研究表明人类的许多生殖障碍、发育异常及某些癌症的发生都与类雌激素有关。这些污染物在环境中的最终归宿是各种水体,并通过食物链的传递在鱼体内富集,而卵黄蛋白原(VTG)是鱼体中类雌激素污染的特异性生物标志物。目前对蛋白质进行定量分析主要有高压液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)和液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)等化学分析方法,但由于化学分析需要提取、富集和浓缩等步骤,前处理复杂,费时、费力,灵敏度低,不适合大量样品的分析和筛选。

[0003] 鲢鱼是我国主要的水产养殖和加工品种,而卵黄蛋白原的主要分子特征在种间都存在较大变异性,因此需要在鲢鱼 VTG 纯化和特异性多克隆抗体产生基础上制备检测鲢鱼卵黄蛋白原的试剂盒,用来快速测定鲢鱼血清、匀浆液及相关液体样本中 VTG 的含量,以此评价鲢鱼体内类雌激素污染状况,为我国类雌激素污染控制决策的制定提供科学依据。

发明内容

[0004] 本发明的目的是针对上述现状,旨在提供一种能快速测定鲢鱼血清、匀浆液及相关液体样本中 VTG 的含量,以此评价鲢鱼体内类雌激素污染状况的检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法。

[0005] 本发明目的的实现方式为,一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备方法,具体步骤如下,

[0006] (1) 鲢鱼卵黄蛋白原的诱导和分离纯化:

[0007] ①配制 100ng/L 的 17α -乙炔基雌二醇充气水溶液,将 3-4 月龄的鲢鱼幼鱼养殖在配制的水溶液中,暴露 10 天,断尾采血获得血清;

[0008] ②血清通过阴离子交换层析柱,所述阴离子交换层析柱填料为 DEAE Sepharose CL-6B,阴离子交换层析柱用 pH 7.5、0.025M Tris-HCl 缓冲液平衡,加入 1 mL 血清样品,用含 0.1-0.5M NaCl、pH 7.5 的 0.025M Tris-HCl 缓冲液进行梯度洗脱,经电泳鉴定,收集含卵黄蛋白原蛋白的洗脱液,透析脱盐后,冷冻干燥制备纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉;

[0009] (2) 鲢鱼卵黄蛋白原多克隆抗体的制备:

[0010] ①大白兔先用弗氏完全佐剂进行预免疫,一周后将 0.5mg/mL 的卵黄蛋白原蛋白液与弗氏完全佐剂按照 1:1 的比例进行初次免疫,两周后将 0.5mg/mL 的卵黄蛋白原蛋白液与弗氏不完全佐剂按照 1:1 的比例进行重复免疫;

[0011] ② 15 天后,从兔耳缘静脉抽取少量血液测量抗体的效价;若抗体效价足够高,则从兔颈动脉放血,制备鲢鱼卵黄蛋白原的抗血清,抗血清经辛酸硫酸铵法纯化,透析离心后

得到特异性的抗 VTG 多克隆抗体(即一抗),分装保存;

[0012] (3) 鲢鱼卵黄蛋白原检测试剂盒制备:将步骤(1)②制备的纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉、步骤(2)②制备的一抗和酶标记的二抗及酶标板放入试剂盒内得检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒。

[0013] 一种用鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒检测鲢鱼体内 VTG 的方法,其步骤如下:

[0014] (1)用权利要求 1 步骤(1)②制备的纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉作为标准蛋白,在酶标板中按照 100 μ L/ 孔量加入 0.025M Tris-HCl 稀释的样品溶液和梯度稀释的 VTG 标准蛋白溶液,制作标准曲线,放入湿盒后 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0015] (2) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/ 孔量加入稀释 1:2000 倍的抗鲢鱼 VTG 多克隆抗体到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温反应 0.5h;

[0016] (3) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/ 孔量加入稀释 1:2000 倍的酶标记的二抗到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温反应 0.5h;

[0017] (4) 倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次,拍干后,按照 100 μ L/ 孔量加入配制好的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液,37 $^{\circ}$ C 下显色反应 15min 后,按照 50 μ L/ 孔加入 2M 硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值,根据步骤(1)制作的标准曲线来计算鲢鱼样品中 VTG 的浓度。

[0018] 本发明通过分离纯化鲢鱼体内的 VTG,然后免疫大白兔制备多克隆抗体,从而制备出检测鲢鱼体内 VTG 的酶联免疫吸附测定试剂盒,采用本检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒能快速测定鲢鱼血清、匀浆液及相关液体样本中 VTG 的含量,以此评价 鲢鱼体内类雌激素污染的状况,为我国类雌激素污染控制决策的制定提供科学依据。

[0019] 本发明不需化学分析提取、富集和浓缩等复杂的前处理步骤,可以直接分析鲢鱼血清、匀浆液及相关液体样本中 VTG 的含量,分析灵敏度高,低至 1.95ng/mL,检测时间短,仅需 3-4 小时,具有省时、省力的优点,适合于大量样品的分析和筛选。

附图说明

[0020] 图 1 是 EE₂ 诱导的鲢鱼血浆中蛋白质的洗脱图谱,

[0021] 图 2 是鲢鱼血浆中蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱,

[0022] 图 3 是鲢鱼 VTG 试剂盒的测试流程图,

[0023] 图 4 是鲢鱼 VTG 试剂盒测试的标准曲线图,

[0024] 图 5 是鲢鱼幼鱼经不同浓度 17 β -雌二醇暴露后体内卵黄蛋白原的浓度。

具体实施方式

[0025] 本发明制备检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的方法是,先进行鲢鱼卵黄蛋白原的诱导和分离纯化,制备出纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉;再进行鲢鱼卵黄蛋白原多克隆抗体的制备,制备出特异性的抗 VTG 多克隆抗体,即一抗;最后将纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉、一抗和市面上已有的酶标记的二抗及市面上已有的酶标板放入试剂盒内,得检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒。

[0026] 用检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒检测鲢鱼体内 VTG 的方法按图 3 所示的流程进行,用纯化的鲢鱼 VTG 冻干粉作为标准蛋白,并在酶标板中加入稀释的样品溶液;加入稀释的抗鲢鱼 VTG 多克隆抗体到酶标板,保温反应;加入稀释的酶标记的二抗到酶标板,保温反

应；加入 3, 3, 5, 5- 四甲基联苯胺底物溶液, 显色反应 15min 后, 加入 2M 硫酸终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值, 根据标准曲线计算鲢鱼样品中 VTG 的浓度。

[0027] 为确定鲢鱼卵黄蛋白原的诱导和分离纯化, 本申请人作了鲢鱼 VTG 的诱导、分离纯化及鉴定试验。

[0028] 试验步骤为：

[0029] 将 3-4 月龄的鲢鱼幼鱼 100 条暴露于 100ng/L 乙炔基雌二醇(EE_2) 中, 诱导鲢鱼幼鱼体内产生 VTG, 10 天后断尾采血用于卵黄蛋白原的分离纯化。结合阴离子交换介质 DEAE- Sepharose CL-6B 和液相层析技术来分离鲢鱼血浆中的卵黄蛋白原。装阴离子交换层析柱后, 用 0.025M, pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液预平衡过夜。上 1 mL 血清样品后, 用 NaCl-Tris-HCl 洗脱缓冲液(0.1-0.5M NaCl, 0.025M Tris-HCl, pH 7.5) 进行梯度洗脱, 为防止卵黄蛋白原的酶解, 在洗脱缓冲液中加入酶抑制剂 PMSF 至终浓度为 2mM, 洗脱速度为 1ml/min, 每 3 分钟收集一管洗脱组分。

[0030] 由于卵黄蛋白原对热敏感, 购买的色谱柱带有冷凝水夹套, 且所有的操作都在低温下进行, 洗脱缓冲液都要先置于 4 °C 冰箱中预冷。用分光光度计检测每管洗脱组分 280nm 处的吸光度值, 以显示洗脱液中成份的变化和蛋白质的浓度, 鲢鱼血浆中蛋白质的洗脱图谱见图 1。

[0031] 分离出的蛋白质组分最终通过电泳确定是否为卵黄蛋白原(见图 2), 电泳按照 Bio-Rad 的仪器说明书进行, SDS-PAGE 电泳浓缩胶和分离胶的凝胶浓度分别为 4% 和 7%, 电压为恒压 100V, 样品在电泳前, 都进行了适当的稀释(100 倍稀释的诱导后的鲢鱼血清; 50 倍稀释的鲢鱼对照血清; 10 倍和 100 倍稀释的经纯化后的鲢鱼 VTG), 以获得最佳的电泳效果, 电泳结束后, 蛋白质组分用考马斯亮蓝 R-250 染色。含 VTG 的洗脱组分集中后在双蒸水中透析 48h, 然后用于冻干粉或 VTG 多克隆抗体的制备。

[0032] 图 1 是鲢鱼血浆中蛋白质的洗脱图谱, 由于卵黄蛋白原是一种磷脂蛋白, 它可与阴离子交换介质紧密结合, 其洗脱时间较长, 可通过色谱柱的长度和改变淋洗缓冲溶液离子强度的变化, 将血浆中的卵黄蛋白原与其它杂蛋白分离开来。利用 SDS-PAGE 电泳检测了图 1 中的几种主要蛋白组分, 结果显示鲢鱼的第三个主峰的蛋白组分分子量很高(图 2), 都是由两个主要亚基组成的, 从图 2 中可以看到这两条蛋白带在没有诱导的性成熟雄鱼体内没有, 仅出现在 EE_2 诱导后的鲢鱼幼鱼血浆中, 因此可以确定洗脱图谱的第三个主峰为鲢鱼 VTG。

[0033] 本申请人做了利用制备的试剂盒和测试方法分析鲢鱼幼鱼经不同浓度 17β -雌二醇(E_2) 暴露后体内卵黄蛋白原的浓度试验。

[0034] 试验步骤为：

[0035] 将鲢鱼幼鱼暴露于 E_2 的下列几个浓度: 空白对照, 20, 50, 100, 200ng/L, 对照组中仅加入助溶剂二甲基亚砷(DMSO), 保证水溶液中 DMSO 的浓度小于 0.01%, 幼鱼暴露实验在 10L 玻璃缸中进行, 每个暴露组随机选取 12 尾实验鱼进行暴露, 每天更换 80% 暴露溶液, 10 天后采样, 称重后, 采集血样制备血清后于 -80 °C 保存待分析。

[0036] 卵黄蛋白原含量的测定按照图 3 的测试流程进行: 用纯化的鲢鱼 VTG 作为标准蛋白, 用鲢鱼 VTG 多克隆抗体作为一抗。在 96 微孔酶标板中加入 0.025M Tris-HCl 稀释的样品溶液和梯度稀释的鲢鱼 VTG 标准样品(100 μ l/孔), 放入湿盒后 4 °C 过夜; 倒出剩余的溶

液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/ 孔加入稀释 1:2000 倍的抗鲢鱼 VTG 多克隆抗体到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温 0.5h ;倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/ 孔加入稀释 1:2000 倍的酶标记的二抗到酶标板,37 $^{\circ}$ C 保温 0.5h ;倒出剩余的溶液,用洗板液清洗 4 次拍干后,按照 100 μ L/ 孔加入配制好的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液,37 $^{\circ}$ C 下显色反应 15min 后,按照 50 μ L/ 孔加入 2M 硫酸终止反应,用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值,根据样品的吸收强度通过图 4 的鲢鱼 VTG 试剂盒测试的标准曲线,计算鲢鱼样品中 VTG 的浓度(μ g/g)。图 4 的标准曲线中,横坐标为鲢鱼 VTG 浓度,纵坐标为 450nm 处的吸光度值。

[0037] 图 5 为雌激素 E_2 暴露对鲢鱼幼鱼体内卵黄蛋白原的诱导。从图 5 可见, 鲢鱼幼鱼体内卵黄蛋白原的诱导与 E_2 暴露浓度有很好的相关性。在暴露前鲢鱼幼鱼体内 VTG 的含量很低,经 E_2 暴露后,100ng/L 暴露组鲢鱼幼鱼体内 VTG 就开始有显著诱导,说明本试剂盒可以对鲢鱼体内 VTG 的含量能进行快速定量测定,并用来评价鲢鱼体内类雌激素污染的状况。

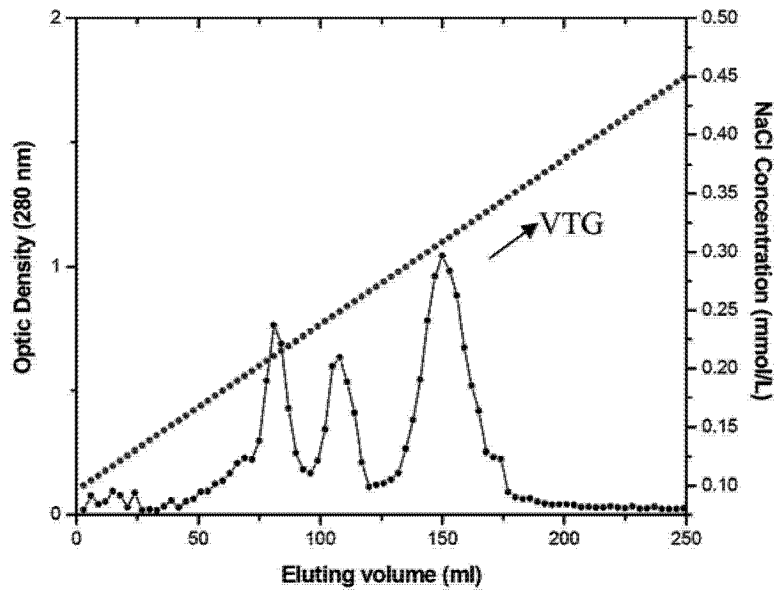


图 1

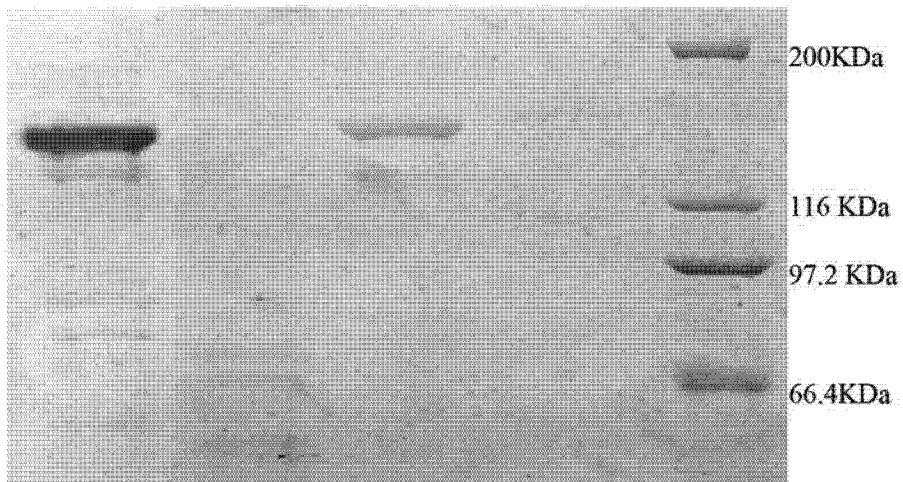


图 2

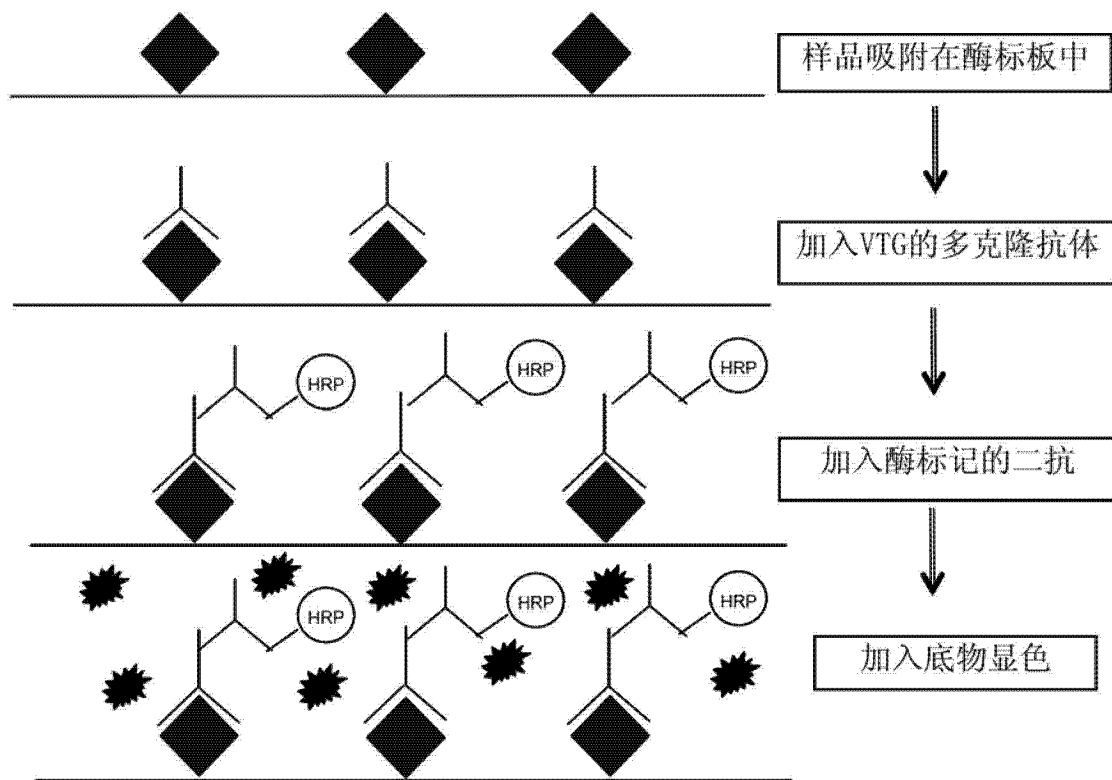


图 3

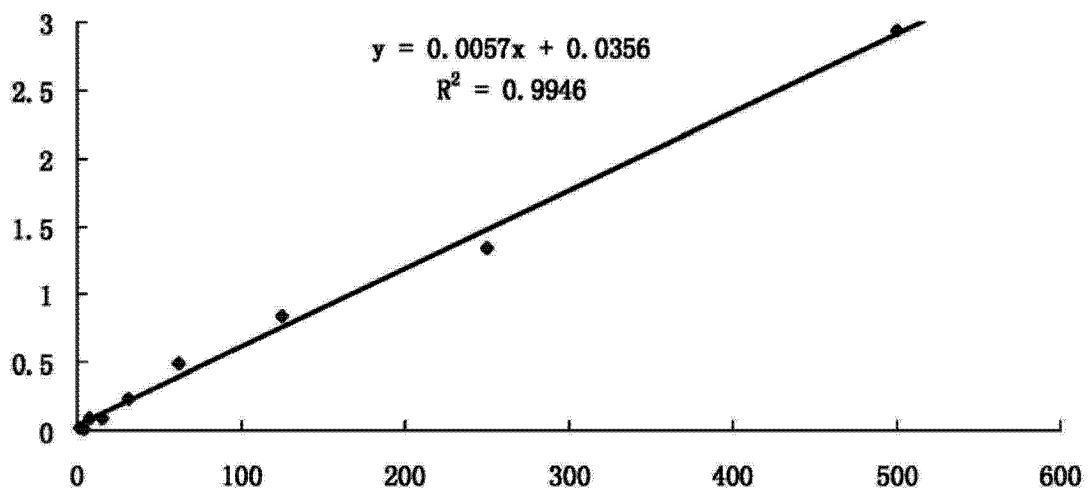


图 4

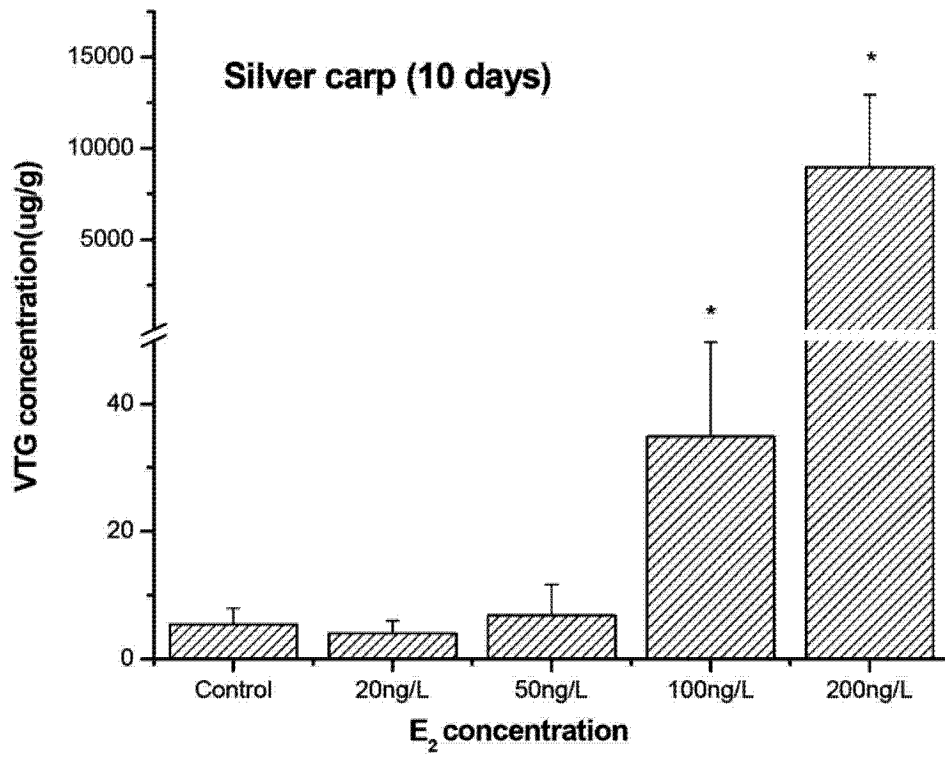


图 5

专利名称(译)	一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法		
公开(公告)号	CN102768282B	公开(公告)日	2014-11-26
申请号	CN201210252420.X	申请日	2012-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所		
申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所		
[标]发明人	廖涛 付云洁 熊光权 徐宏书 王少华 吴文锦 叶敏 李新 耿胜荣 鉏晓艳 夏和舟		
发明人	廖涛 付云洁 熊光权 徐宏书 王少华 吴文锦 叶敏 李新 耿胜荣 鉏晓艳 夏和舟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	朱盛华		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102768282A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测鲢鱼卵黄蛋白原试剂盒的制备及检测方法，制备方法是，鲢鱼VTG的诱导和分离制备纯化的鲢鱼VTG冻干粉；制备特异性的抗VTG多克隆抗体，即一抗；将纯化的鲢鱼VTG冻干粉、一抗和酶标记的二抗及酶标板放入试剂盒内，得检测鲢鱼VTG试剂盒。测试方法是，用纯化的鲢鱼VTG冻干粉作为标准蛋白并在酶标板中加入稀释的样品溶液；加入一抗到酶标板保温反应；加入酶标记的二抗到酶标板保温反应；加入3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液显色反应，用酶标仪测定吸光度值，计算鲢鱼样品中VTG的浓度。本发明能快速测试鲢鱼血清、匀浆液等中VTG的含量，分析灵敏度高，测试时间短，具有省时、省力的优点，适合于大量样品的分析和筛选。

