



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104345156 A

(43) 申请公布日 2015.02.11

(21) 申请号 201410644731.X

G01N 33/531 (2006.01)

(22) 申请日 2014.11.14

G01N 33/74 (2006.01)

(71) 申请人 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址 266071 山东省青岛市市南区南京路106号

(72) 发明人 王松 王骏 张铁军 冷凯良 苗钧魁 姜勇 罗忻 吴振兴

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所 37218

代理人 褚庆森

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

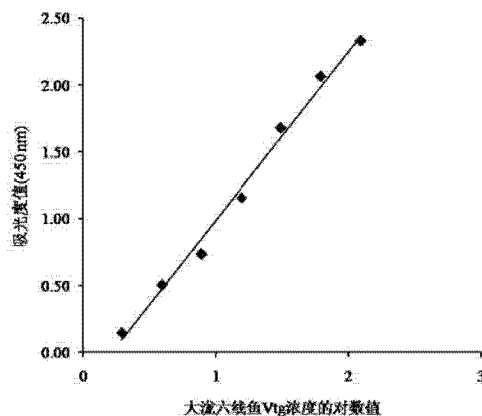
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法、检测方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心 ELISA 试剂盒、制备方法、检测方法及应用。本发明通过硫酸铵沉淀与 SephadexG-200 从 17β-雌二醇诱导的大泷六线鱼血浆中纯化出卵黄原蛋白,制备多克隆抗体,并将辣根过氧化物酶标记到纯化的抗体上;将大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品、兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、空白 96 孔酶标板、以及包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止液各 1 支共同装入盒体,得到检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒。本发明的试剂盒能够灵敏、准确的定量检测大泷六线鱼血浆、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白,检测范围为 1.95 ~ 125ngmL<sup>-1</sup>,为我国近岸海域内分泌干扰物的检测提供了重要工具。



1. 一种检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒,包括一个箱体,箱体内有空白 96 孔酶标板 1 块,封闭液、包被液、洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液各 1 支,其特征在于该箱体还装有:大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支,兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支、辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支。

2. 如权利要求 1 所述的检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的间接 ELISA 试剂盒,其特征在于,所述的包被液为 50mM pH 9.6 碳酸盐缓冲液;

洗涤液为含质量分数是 0.05% Tween-20 的 150mM pH7.4 的磷酸盐缓冲液;

封闭液为含质量分数是 2% BSA 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液;

样品稀释液为含质量分数是 0.05% Tween-20、1% BSA 的 150mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4;

显色液为 TMB 单组分显色液;

终止剂为 2 M  $H_2SO_4$  水溶液。

3. 如权利要求 1 所述的检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的间接 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤如下:

1) 制备大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品;

2) 利用步骤 1) 得到的大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品制备兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体;

3) 利用步骤 2) 制得的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体制备辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体;

4) 将步骤 1) 得到的大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支、步骤 2) 得到的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体 1 支、步骤 3) 得到辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支,以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液各 1 支放入盒内,得到检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒。

4. 如权利要求 3 所述的检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的间接 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品的制备方法如下:

采用肌肉注射  $17\beta$ -雌二醇 ( $17\beta$ -estradiol,  $E_2$ ) 的方式诱导大泷六线鱼产生卵黄原蛋白;注射一周后取血,  $4^\circ C$ , 5000 g 离心 10 分钟,收集上清液;向上清中加入等体积的饱和硫酸铵溶液,冰浴条件下摇晃 2 小时后离心,向沉淀中加入 pH 7.5、25mM Tris-HCl,使沉淀重新溶解;进一步的纯化采用 1.5' 20 cm 的 Sephadex G-200 层析柱,加入 1 ml 上述溶液,用 pH 7.5 的 25mM Tris-HCl 洗层析柱,收集第一个洗脱峰,即为大泷六线鱼卵黄原蛋白。

5. 如权利要求 3 所述的检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的间接 ELISA 试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

取 600  $\mu$ g 纯化的大泷六线鱼卵黄原蛋白,加入等体积的弗氏完全佐剂,对大白兔进行背部皮下多点注射,两周后再次加强免疫,免疫剂量为 600  $\mu$ g/只,用弗氏不完全佐剂充分乳化后进行背部皮下注射;此后,每隔 10 天按以上方法进行加强免疫;于每 5 次注射 5 天后从心脏取血,6000 g 离心 20 分钟,收集上清,获得了兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清;向抗血清中加入等体积的 PH 7.4 0.02 mol/L 磷酸缓冲液;在冰浴条件下加入硫酸铵,至 50% 饱和度,  $0^\circ C$  震荡 2h 后,低温离心,8000 g、15min,弃上清,沉淀用 10ml 0.02mol/L 磷酸缓冲液溶解;以 0.02mol/L 磷酸缓冲液透析 24h;用 0.45 微米孔径的滤膜过滤后,上

Hitrap Protein G柱,随后以0.02 mol/L磷酸缓冲液洗脱10个柱体积,然后以pH2.7、0.1M甘氨酸洗脱抗体,即获得兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体。

6. 如权利要求3所述的定量检测大龙六线鱼卵黄原蛋白夹心ELISA试剂盒的制备方法,其特征在于,所述的辣根过氧化物酶标记兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

向3mg/mL的辣根过氧化物酶中加入0.2ml新配的0.1M NaIO<sub>4</sub>溶液,4℃避光搅拌20分钟;将溶液装入透析袋中,用pH4.4、1mM的醋酸钠缓冲液透析过夜;取出,加入0.16 M乙二醇水溶液0.5ml,4℃摇晃30min;加入纯化抗体的水溶液1ml,混匀,并装入透析袋,对pH9.5、0.05M碳酸盐缓冲液透析过夜;加入0.1ml新配的5mg/ml的NaBH<sub>4</sub>溶液,混匀,置4℃,2h;缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液,4℃,震荡30min后,5000rpm离心10min,沉淀物溶于少量pH7.4、0.15M的PBS中,装入透析袋,在4℃透析过夜;5000r/min离心10min,收集上清液即为酶标记抗体。

7. 权利要求1所述的大龙六线鱼卵黄原蛋白夹心ELISA试剂盒,在海洋环境雌激素类物质筛选与内分泌扰乱化学物质研究中的应用。

8. 利用权利要求1所述的大龙六线鱼卵黄原蛋白夹心ELISA试剂盒检测大龙六线鱼卵黄原蛋白的方法,包括以下步骤:

1) 用包被液稀释试剂盒中的兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体至3 μg/ml,在空白96孔酶标板中加入100 μL/孔,4℃包被过夜,或者37℃下孵育2小时;弃去孔内溶液,洗涤3次;

2) 在96孔酶标板中加入封闭液,300 μL/孔,室温下孵育1小时;弃去孔内溶液,洗涤3次;

3) 用样品稀释液将大龙六线鱼卵黄原蛋白标准品稀释至1.95、3.9、7.8、15.62、31.25、62.5、125 ng/ml;在96孔酶标板中加入各标准品、待测样品100 μL/孔,37℃下孵育1小时;弃去孔内溶液,洗涤5次;

4) 在96孔酶标板中加入用样品稀释液1:4000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体,100 μL/孔,室温孵育1小时;弃去孔内溶液,洗涤5次;

5) 在96孔酶标板中加入显色液,100 μL/孔,于室温暗处37℃反应10min;

6) 待呈现明显的黄色后加终止剂,50 μL/孔;

7) 用酶标仪测定450nm波长下各孔的吸光值,测定应在加终止液后15分钟以内进行;

8) 计算:以标准物的浓度的对数值为横坐标,OD值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度;再乘以稀释倍数;或用标准物的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的OD值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

## 大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心 ELISA 试剂盒及其制备方法、 检测方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生态检测领域,具体涉及一种大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心 ELISA 试剂盒的制备及应用。

### 背景技术

[0002] 持久性有机污染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs),是指在环境中难以分解,能够在环境中长期存在,可以通过各种传输途径而进行全球尺度的迁移扩散,通过食物链在生物体内累积放大,对人体和环境产生毒性影响的一类有机污染物。这些污染物并不是自然界本身就存在的,而是人类工业革命带来的产物。持久性有机污染物给人类和环境带来的危害已经成为全球性问题。为了解决这一问题,联合国环境规划署 (UNEP) 和瑞典政府于 2001 年 5 月 23 日在瑞典的斯德哥尔摩联合主持召开全权代表会议,签署了旨在禁止和 / 或限制使用 12 类持久性有机污染物的《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》。POPs 具有下列四个重要的特性:(1) 能够在环境中持久地存在;(2) 能够经过长距离迁移到达偏远的极低地区。(3) 在一定的浓度下会对接触该物质的生物造成有害或有毒影响,POPs 大都具有“三致(致癌、致畸、致突变)”效应;(4) 能蓄积在食物链中,对有较高营养等级的生物造成影响。由于 POPs 具有低水溶性、高脂溶性的特点,导致 POPs 从周围媒介中富集到生物体内,并通过食物链的生物放大作用达到中毒浓度。

[0003] POPs 在海洋环境中难降解、分布广、易在生物体内富集,对生态环境的危害性很大,POPs 不仅影响到海洋生物的栖息与繁殖,通过食物链的传递,也给人类自身生存和生活造成威胁。各项研究显示 POPs 浓度水平并不很高,但是由于其生物富集性可通过食物链传递富集,使得处于食物链越高的生物受到的威胁越大。在海洋环境和其他水生生态系统中,POPs 的传播链是:空气中的 POPs 最初是被微生物吸收→较大生物吃微小生物→小鱼食用较大生物→大鱼吃小鱼→有时是鸟类或人类食用大鱼。食肉类物种体内的 POPs 含量将会达到其捕食对象体内 POPs 平均含量的 10 倍之多。这导致了在最高端食肉物种体内极高的 POPs 含量。根据环境加拿大(Environment Canada)组织的报告,食用鱼类的鸟蛋中 POPs 污染物达到鱼类本身生活的水中 POPs 含量的 2500 万倍。而位于生物链顶端的人类,则又把这些毒性放大了 7 万倍。

[0004] 当前急需全面提升海洋 POPs 实时监测、预警能力,对海水养殖的污染源进行研究,探讨鱼类饲料、人类活动及环境因素等对水产品质量的影响,为海水养殖产品的质量监控和海域环境的管理提供科学依据。因此建立起快速、高效、大通量针对 POPs 特别是新增种类污染物的有效检测方法是加强和完善对环境中 POPs 的检测及风险控制管理的前提和基础。研究表明,大多数 POPs 具有环境雌激素效应,是环境雌激素类似物,因此可以将环境雌激素生物检测方法用于 POPs 的生物检测。

[0005] 美国、欧盟和日本相继建立起以鱼类为模式生物的环境雌激素筛选评价体系,其中卵黄原蛋白 (Vitellogenin, Vtg) 作为重要的生物筛选指标,已经得到广泛应用。鱼类卵

黄原蛋白是卵黄蛋白的前体,是一种大分子量的脂磷聚糖蛋白。卵黄形成期,在雌激素的刺激下卵黄原蛋白由肝脏合成,并通过血液运输到发育的卵巢中,被卵巢吸收;通常,卵黄原蛋白只能在卵黄形成期的雌鱼体内检测到,但是,雄鱼和幼鱼体内也含有卵黄原蛋白基因,在环境雌激素的诱导下,也能合成和分泌卵黄原蛋白。因此,卵黄原蛋白是环境雌激素筛选的特异性生物标志物,通过检测雄鱼体内卵黄原蛋白水平可以评价环境化学物的雌激素活性。然而,至今我国还未见海洋环境 POPs 生物监测技术的研发。

[0006] 大泷六线鱼 (*Hexagrammos otakii Jordan et Starks*) 又名欧式六线鱼,俗称黄鱼,隶属于鲉形目 (Scorpaeniformes)、六线鱼科 (Hexagrammidae)、六线鱼属 (*Hexagrammos*)。大泷六线鱼属冷温性近海底层鱼类,在我国主要分布于黄海和渤海沿岸多岩礁海区,在青岛近海水域中容易捕获。因此,以黄渤海常见鱼种大泷六线鱼为实验生物,建立其卵黄原蛋白的定量检测技术,有助于开展我国近岸海域 POPs 生物监测工作。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心 ELISA 试剂盒的制备及应用,以满足现有技术的上述要求。

[0008] 一种检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒,包括一个盒体,空白 96 孔酶标板 1 块,包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止剂,其特征在于它还装有大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支、兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支、辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支。

[0009] 上述检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

- 1) 制备大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品;
- 2) 利用步骤 1) 得到的大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品制备兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体;
- 3) 利用步骤 2) 制得的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体制备辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体;
- 4) 将步骤 1) 得到的大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支、步骤 2) 得到的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白抗体 1 支、步骤 3) 得到辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支,以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液各 1 支放入盒内,得到检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒。

[0010] 上述定量检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的试剂盒在内分泌扰乱化学物质调查与筛选中的应用。

[0011] 本发明的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,可灵敏、准确、方便地检测大泷六线鱼血浆、体表粘液、肝脏组织和肝细胞培养液中的卵黄原蛋白,其检测范围为 1.95 ~ 125 ng/ml,为海洋内分泌扰乱化学物质的检测和生态环境风险评估提供了一个有效的手段。

[0012] 目前,已经纯化了多种鱼类的卵黄原蛋白,并且制备成抗体用于环境雌激素的检测。鱼类的卵黄原蛋白的纯化多采用两步层析法,该方法不仅操作复杂,费时费力,还容易造成卵黄原蛋白的降解。本发明首次建立了六线鱼卵黄原蛋白的纯化方案,采用硫酸铵

沉淀预处理血浆,可明显提高卵黄原蛋白的浓度与纯度,然后再采用价格低廉的 Sephadex G-200 层析柱直接纯化获得了大泷六线鱼卵黄原蛋白,较其它鱼类卵黄原蛋白的纯化方案更加省时、操作简便,还极大提高了纯化蛋白的浓度,本发明还利用辣根过氧化物酶标记了纯化的抗体,建立的夹心 ELISA 操作更加简便、省时,检测更加敏感。本发现的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,能够灵敏、方便地定量检测大泷六线鱼在不同污染物暴露下体内卵黄原蛋白的生成水平,为评价我国近岸海域的环境雌激素效应提供了快捷的手段。

## 附图说明

[0013] 图 1 为本发明的试剂盒对大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品的检测结果;

图 2 为本发明的试剂盒对雌 / 雄大泷六线鱼血浆的检测结果。

[0014] 具体实施方式:

下面将结合附图以及进一步的详细说明来举例说明本发明。需要指出的是,以下说明仅仅是对本发明要求保护的技术方案的举例说明,并非对这些技术方案的任何限制。本发明的保护范围以所附权利要求书记载的内容为准。

[0015] 实施例 1 ELISA 试剂盒的制备

制备检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒分为以下步骤:

(1) 卵黄原蛋白的分离纯化

采用肌肉注射  $17\beta$ -雌二醇 ( $17\beta$ -estradiol,  $E_2$ ) 的方式诱导大泷六线鱼产生卵黄原蛋白。注射一周后取血,  $4^\circ\text{C}$ , 5000 g 离心 10 分钟, 收集上清液; 向上清中加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 冰浴条件下摇晃 2 小时后 5000 g 离心 10 分钟, 向沉淀中加入 25mM Tris-HCl (pH 7.5), 使沉淀重新溶解。进一步的纯化采用 Sephadex G-200 层析柱 (1.5' 20 cm), 加入 1 ml 上述溶液, 用 25mM Tris-HCl (pH 7.5) 以流速 0.3 ml/min 冲洗层析柱, 收集第一个洗脱峰, 即为大泷六线鱼卵黄原蛋白。

[0016] (2) 卵黄原蛋白多克隆抗体的制备

取 600  $\mu\text{g}$  纯化的大泷六线鱼卵黄原蛋白, 加入等体积的弗氏完全佐剂, 充分乳化后对新西兰大白兔进行背部皮下多点注射, 每点注射 0.1ml, 两周后再次加强免疫, 免疫剂量为 600  $\mu\text{g}$ /只, 用弗氏不完全佐剂充分乳化后进行背部皮下注射。此后, 每隔 7 天按以上方法进行加强免疫。于每 5 次注射 5 天后从心脏取血, 6000r/min 离心 20 分钟, 收集上清, 获得了兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗血清。抗体的纯化分为以下几步, 上样前向多克隆抗血浆中加入 1/3 左右的对照阴性样品 (雄鱼匀浆液), 低温振荡 2h,  $4^\circ\text{C}$  过夜, 次日离心取上清; 向上清中加入等体积的 PH 7.4 0.02 mol/L 磷酸缓冲液; 在冰浴条件下加入硫酸铵, 至 50% 饱和度,  $0^\circ\text{C}$  震荡 2h 后, 低温离心 (8000rpm, 15min), 弃上清, 沉淀用 10ml 0.02mol/L 磷酸缓冲液溶解; 以 0.02mol/L 磷酸缓冲液透析 24h, 其间换液 4 次; 用 0.45 微米孔径的滤膜过滤后, 上 Hitrap Protein G 柱, 随后以 0.02mol/L 磷酸缓冲液洗脱 10 个柱体积, 然后以 0.1M 甘氨酸 (pH2.7) 洗脱抗体, 即获得兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体。

[0017] (3) 辣根过氧化物酶标记兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备

向 3mg/mL 的辣根过氧化物酶中加入 0.2ml 新配的 0.1M  $\text{NaIO}_4$  溶液,  $4^\circ\text{C}$  避光搅拌 20 分钟; 将溶液装入透析袋中, 用 1mM 的醋酸钠缓冲液 (pH4.4) 透析过夜; 取出, 加入 0.16 M

乙二醇水溶液 0.5ml, 4℃ 摇晃 30min; 加入纯化抗体的水溶液 1ml, 混匀, 并装入透析袋, 对 0.05M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.5) 透析过夜; 加入 0.1ml 新配的  $\text{NaBH}_4$  溶液 (5mg/ml), 混匀, 置 4℃, 2h; 缓慢加入等体积的饱和硫酸铵溶液, 4℃, 震荡 30min 后, 5000rpm 离心 10min, 沉淀物溶于少量 0.15M 的 PBS (pH7.4) 中, 装入透析袋, 在 4℃ 透析过夜; 5000r/min 离心 10min, 收集上清液即为酶标记抗体。

[0018] (4) 将制备的大龙六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支、兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支、辣根过氧化物酶标记兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支、空白 96 孔酶标板一块, 以及包被液、封闭液、样品稀释液、洗涤液、显色液和终止液 1 支装入盒体内, 构成本发明的试剂盒。其具体组成如下:

- 1) 空白 96 孔酶标板 1 块;
- 2) 大龙六线鱼卵黄原蛋白纯品 1 支, 使用前用样品稀释液稀释到所需浓度;
- 3) 兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支, 使用前用包被液稀释至  $3\mu\text{g/ml}$ ;
- 4) 辣根过氧化物酶标记的兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支, 使用前用样品稀释液按 1:5000 的体积比稀释;
- 5) 包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止剂各 1 支,

所述的包被液为 50mM pH 9.6 碳酸盐缓冲液: 1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93g  $\text{NaHCO}_3$ , 加蒸馏水至 1000ml;

洗涤液为含 0.05% Tween-20 的 150mM pH7.4 磷酸盐缓冲液: 8.0g  $\text{NaCl}$ , 0.2g  $\text{KCl}$ , 2.9g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 ml Tween-20, 加蒸馏水至 1000ml;

封闭液为含 2% BSA 的 pH7.4 磷酸盐缓冲液: 0.2g BSA 溶于 10ml pH7.4 的磷酸缓冲液中;

样品稀释液为含 0.05% Tween-20、1% BSA 的 150mM 磷酸盐缓冲液, pH 7.4: 0.1g BSA 溶于 10 ml 洗涤液;

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;

终止剂为 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  水溶液。

[0019] 实施例 2 ELISA 试剂盒对大龙六线鱼卵黄原蛋白纯品的检测

实施例 1 制备的 ELISA 试剂盒使用时分为以下步骤:

1) 用包被液稀释试剂盒中的兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体至  $3\mu\text{g/ml}$ , 在空白 96 孔酶标板中加入  $100\mu\text{L}$ /孔, 4℃ 包被过夜, 或者 37℃ 下孵育 2 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 3 次。

[0020] 2) 在 96 孔酶标板中加入封闭液,  $300\mu\text{L}$ /孔, 室温下孵育 1 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 3 次。

[0021] 3) 用样品稀释液将大龙六线鱼卵黄原蛋白标准品稀释至 1.95、3.9、7.8、15.62、31.25、62.5、125 ng/ml。在 96 孔酶标板中加入各标准品、待测样品  $100\mu\text{L}$ /孔, 37℃ 下孵育 1 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 5 次。

[0022] 4) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液 1:4000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗大龙六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体,  $100\mu\text{L}$ /孔, 室温孵育 1 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 5 次。

[0023] 5) 在 96 孔酶标板中加入显色液,  $100\mu\text{L}$ /孔, 于室温暗处 37℃ 反应 10min。

[0024] 6) 待呈现明显的黄色后加终止剂, 50  $\mu$  L/ 孔。

[0025] 7) 用酶标仪测定 450nm 波长下各孔的吸光值, 测定应在加终止液后 15 分钟以内进行。

[0026] 8) 计算 : 以标准物的浓度的对数值为横坐标, OD 值为纵坐标, 在坐标纸上绘出标准曲线, 根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度 ; 再乘以稀释倍数 ; 或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式, 将样品的 OD 值代入方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。具体结果参见图 1。

#### 实施例 3 本发明 ELISA 试剂盒对雌 / 雄大泷六线鱼血浆的检测

采用肌肉注射  $17\beta$ -雌二醇 ( $17\beta$ -estradiol,  $E_2$ ) 的方式诱导大泷六线鱼产生卵黄原蛋白。注射一周后取血, 对血浆进行逐步稀释后 ; 采用实施例 2 的方法对其进行检测, 具体结果参见图 2。

#### 实施例 4 最低检测限的确定

取大泷六线鱼卵黄原蛋白标准品浓度为 10ng/ml, 逐步稀释至 5、2.5、1.25、0.625、0.312 和 0.156ng/ml, 采用实施例 2 的方法对各浓度标准品进行检测, 每个浓度设置 2 个复孔, 空白孔加入与标准品组等量的样品稀释液做为对照, 以测得的 P/N 值大于 2.1 时的最低浓度做为最低检测限, 经检测, 本发明 ELISA 试剂盒的最低检测限为 0.312ng/ml。

#### [0027] 实施例 5 样品稀释液组成的确定

样品稀释液一共分成 5 组, 第 1 组 : 0.15M 的 PBS ; 第 2 组 : PBST (0.15M 的 PBS, 含 tween-20 0.05%, pH 7.4) ; 第 3 组 : PBST (0.15M 的 PBS, 含 tween-20 0.05%, pH 7.4)+1%BSA ; 第 4 组 : PBST (0.10M 的 PBS, 含 tween-20 0.05%, pH 7.4)+1%BSA ; 第 5 组 : PBST (0.20M 的 PBS, 含 tween-20 0.05%, pH 7.4)+1%BSA, 用浓度为 10ng/ml 的大泷六线鱼卵黄原蛋白标准品进行检测 (方法参见实施例 2), 根据 P/N 值确定最佳的样品稀释液, 具体结果如下 :

	P/N 值
组 1	4.2
组 2	8.7
组 3	17.6
组 4	11.3
组 5	9.8

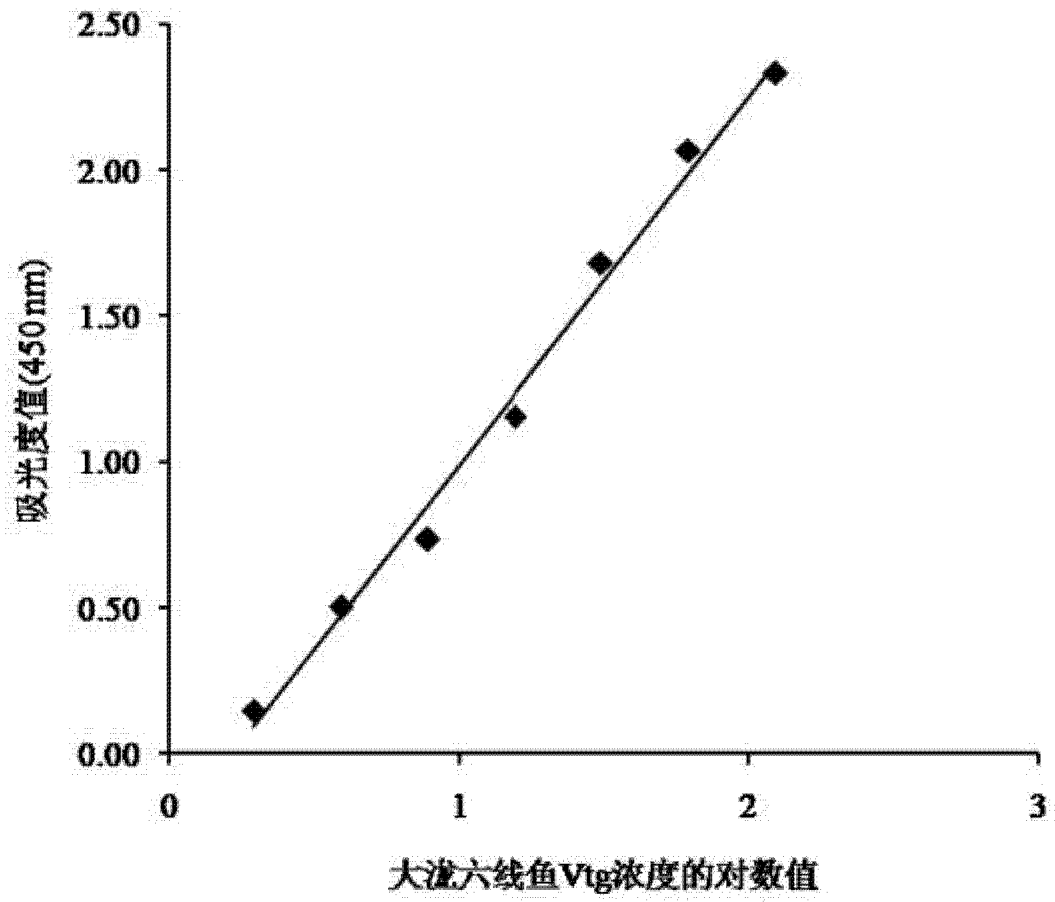


图 1

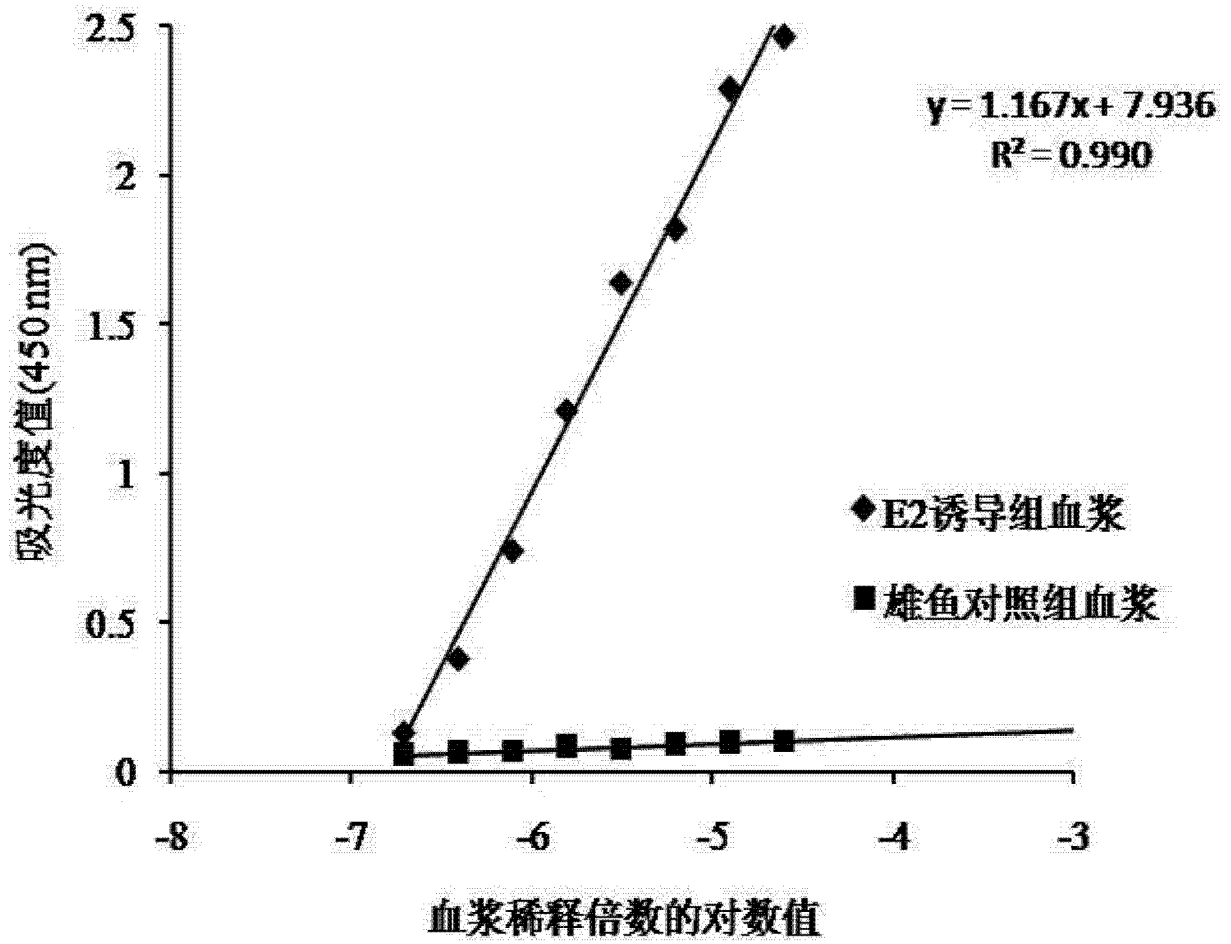


图 2

专利名称(译)	大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心ELISA试剂盒及其制备方法、检测方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104345156A</a>	公开(公告)日	2015-02-11
申请号	CN201410644731.X	申请日	2014-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黄海水产研究所		
申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黄海水产研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国水产科学研究院黄海水产研究所		
[标]发明人	王松 王骏 张铁军 冷凯良 苗钧魁 姜勇 罗忻 吴振兴		
发明人	王松 王骏 张铁军 冷凯良 苗钧魁 姜勇 罗忻 吴振兴		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/74		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/689 G01N33/743		
其他公开文献	CN104345156B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种大泷六线鱼卵黄原蛋白夹心ELISA试剂盒、制备方法、检测方法及应用。本发明通过硫酸铵沉淀与SephadexG-200从17β-雌二醇诱导的大泷六线鱼血浆中纯化出卵黄原蛋白，制备多克隆抗体，并将辣根过氧化物酶标记到纯化的抗体上；将大泷六线鱼卵黄原蛋白纯品、兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗大泷六线鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、空白96孔酶标板、以及包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止液各1支共同装入盒体，得到检测大泷六线鱼卵黄原蛋白的夹心ELISA试剂盒。本发明的试剂盒能够灵敏、准确的定量检测大泷六线鱼血浆、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白，检测范围为1.95~125ngmL<sup>-1</sup>，为我国近岸海域内分泌干扰物的检测提供了重要工具。

