



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569423 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201410752194. 0

(22) 申请日 2014. 12. 09

(71) 申请人 中国海洋大学

地址 266100 山东省青岛市崂山区松岭路
238 号

(72) 发明人 汝少国 王军 王蔚 田华

(74) 专利代理机构 青岛海昊知识产权事务所有
限公司 37201

代理人 张中南 邱岳

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

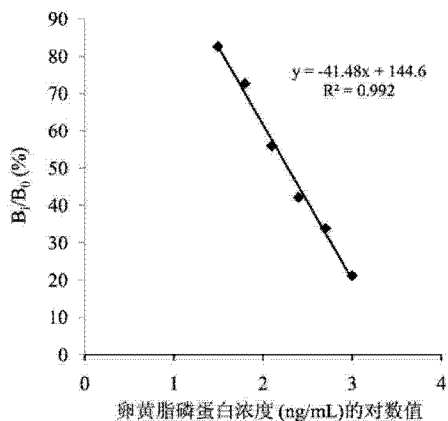
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法与应用

(57) 摘要

斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法与应用。通过两步层析与超滤相结合的方法从斑马鱼卵巢与 17β - 雌二醇暴露后的斑马鱼体内中分别纯化出卵黄脂磷蛋白与卵黄原蛋白, 制备兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体; 将斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品、兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、空白 96 孔酶标板 1 块、以及包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各 1 支共同装入盒体, 得到检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒。本发明的试剂盒可以应用于环境类雌激素物质的调查中, 能够灵敏、准确、方便的定量检测斑马鱼血浆、整体匀浆液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白, 检测范围为 31. 25 ~ 1000ng mL⁻¹, 为斑马鱼在内分泌干扰物检测领域的应用提供了重要工具。



1. 一种检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒,包括一个箱体,盒体内有空白 96 孔酶标板 1 块,封闭液、包被液、洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各 1 支,

其特征在于该箱体还装有:斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支,兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支。

2. 根据权利要求 1 所述的检测斑马鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒,其特征在于所述的斑马鱼卵黄脂磷蛋白制备方法如下:将斑马鱼卵巢取出后称重,加入 3 倍体积 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液(内含 1mM PMSF, pH 7.4)混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,8000g 离心 10 分钟,收集上清液;将上清液进行离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow),用分别含 0.07M、0.1M、0.2M 和 1.0M NaCl 的 25mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)进行不连续洗脱。收集 0.2M 洗脱组分,装入截留分子量为 100kDa 的 Millipore 超滤离心管,4℃、3000g 离心 30 分钟,加入 1ml PBS 缓冲液,收集截留在超滤离心管膜上的溶液;取 1ml 收集液加入 Sephadex G-200 层析柱,用 25mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)洗脱,收集第一个主洗脱峰,即为斑马鱼卵黄脂磷蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的检测斑马鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒,其特征在于所述的兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

(1) 斑马鱼卵黄原蛋白纯品的制备:采用水体暴露 17 β -雌二醇的方式诱导斑马鱼产生卵黄原蛋白,将斑马鱼置于 2L 的玻璃缸中,每缸放入 10 尾斑马鱼,17 β -雌二醇的暴露浓度为 200 μ g/L,每天全部换水,并重新加入相应的 17 β -雌二醇,早晚投喂饲料,水温 26℃;7 天后将斑马鱼放入 50% 的酒精中,待斑马鱼麻醉后,取出称重,并加入 3 倍体积 4℃ 预冷的 PBS 缓冲液(内含 1mM PMSF, pH 7.5),在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃、8000g 离心 10 分钟,收集上清液;利用权利要求 2 的方法从上清液中纯化获得斑马鱼卵黄原蛋白;

(2) 兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备:取 600 μ g 纯化的斑马鱼卵黄原蛋白,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 μ 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;第 5 次注射后于第 5 天从心脏取血,6000r/min 离心 20 分钟,收集上清,获得了兔抗斑马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清中加入 1/3 的对照阴性样品(雄鱼匀浆液),低温振荡 2h,4℃ 过夜,次日离心取上清;向上清中加入等体积的 PBS 缓冲液;在冰浴条件下加入等体积饱和硫酸铵,0℃ 震荡 2h 后,低温离心(8000rpm, 15min),弃上清,沉淀用 10ml PBS 缓冲液溶解;用 0.45 微米孔径的滤膜过滤后,上 Hitrap Protein G 柱,以 PBS 缓冲液洗脱 10 个柱体积后,用 0.1M 甘氨酸(pH 2.7)洗脱,即获得兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体。

4. 权利要求 1 所述的检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒在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。

5. 利用权利要求 1 所述的试剂盒进行内分泌扰乱化学物质检测的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 用包被液稀释试剂盒中的斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品至 400ng/L,在空白 96 孔酶标板中加入 100 μ l/孔,4℃ 包被过夜。弃去孔内溶液,洗涤 3 次。

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

3) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液稀释了的斑马鱼卵黄脂磷蛋白标准品、待测样品 50 μ L/ 孔, 并在每孔加入 50 μ L 用样品稀释液 1:5000 倍稀释的兔抗斑马鱼卵黄原蛋白抗体, 37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 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 1:2000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 100 μ L/ 孔, 室温孵育 1 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 5 次。

5) 在 96 孔酶标板中加入新鲜配制的显色液, 100 μ L/ 孔, 于室温暗处 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。

6) 待呈现明显的黄色后加终止剂, 50 μ L/ 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 : 以标准品浓度的对数值为横坐标, 吸光率为纵坐标, 绘制出标准曲线。吸光率公式为 : $B_i/B_0(\%) = (OD-NSB)/(OD_0-NSB) \times 100$ 。 B_i 为标准品或样品 OD 值, B_0 为标准品 0 的 OD 值, NSB 为非特异性结合的 OD 值。本实验中 NSB 为测定 PBS 包被的 OD 值。根据样品的 OD 值计算其吸光率, 由标准曲线计算出相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境检测领域,具体涉及一种斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法与应用。

背景技术

[0002] 随着我国工业化程度和人民群众生活水平的不断提高,大量的工业废水和生活污水排入到江河湖海中,造成了严重的水环境污染,不仅危害了野生生物的生存,也严重威胁我国人民的健康。虽然这些污染物在环境中的浓度很低,但是能够干扰人和动物体内激素的合成、释放、运输、代谢,以及激素与受体的结合、功能的表达等一系列生物过程,从而扰乱人和动物内分泌系统、神经系统和免疫系统的机能,甚至对生物后代的生殖功能造成潜在影响,这一类化学物质统称为内分泌扰乱化学物质。其中,环境雌激素对野生动物和人类生殖系统的影响受到了广泛关注,已成为继臭氧层、气候变暖之后的第三大环境问题。环境雌激素种类繁多,包括多氯联苯类、二恶英类、农药类、双酚类、金属化合类、类固醇类等,其中塑化剂、杀虫剂、避孕药等被人们广泛利用,它们的雌激素效应已引起了人们越来越多的关注。近年来,关于环境雌激素污染的报道越来越多。早在 1985 年,人们就在英国城市污水处理厂下游河流中捕获到了具有雌雄两性特征的斜齿鳊鱼,我国武汉市东湖部分鱼类出现了“雄鱼雌化”现象,并且在长江、太湖、珠三角河流中都检测到了雌激素类物质。环境雌激素除了造成鱼虾生长速度减慢、畸形等现象外,还能够通过生物浓缩、生物积累和生物放大等途径增大浓度,对生物和人类造成更大危害。因此,为了减少环境雌激素的危害,有必要建立化学物质的环境雌激素活性筛选体系,制备能够快速检测雌激素活性的试剂盒。

[0003] 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。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合物的雌激素活性。

[0004] 斑马鱼 (*Danio reeio*),属于辐鳍亚纲 (Actinopterygii) 鲤科 (Cyprinidae) 短担尼鱼属 (*Danio*) 的一种硬骨鱼,具备以下独特优点:(1) 价格便宜,容易获得,并且易于管理;(2) 体型小,在较小空间内就可饲养大量斑马鱼 (2L 的烧杯中就可饲养 10 条左右),便于毒理学试验得到较大样本量 (3) 斑马鱼对内分泌干扰物反应敏感,内分泌干扰物结构多样,种类众多,并且新的内分泌干扰物不断出现,研究表明斑马鱼可以作为评价内分泌干扰物的一个模型;(4) 斑马鱼的雌雄鱼在体形上较易分辨。雌鱼体型通常较大,腹部较鼓胀;雄鱼体型稍小,腹部平坦。仔细对照可以看出雌鱼臀鳍的条纹是蓝白相间的,而雄鱼臀鳍是蓝纹间夹着深黄色的条纹。目前,斑马鱼已成为一些生态毒理标准 (如 OECD 和 ISO 标准) 的推荐测试物种,被广泛地应用于环境毒性试验、环境危险度评价、环境污染物生物累积效

应的研究中。

[0005] 研究表明,环境激素暴露可导致雄性斑马鱼卵黄原蛋白生成、发育迟缓、雌性化、雌雄同体、产卵量减少、受精率降低以及性比失衡等变化,其中卵黄原蛋白可能是最敏感的指标。卵黄原蛋白的测定通常采用免疫学方法,其分离纯化是制备抗体、定性定量检测鱼类卵黄原蛋白的基础。研究者多通过 17β -雌二醇 (17β -estradiol, E_2) 腹腔注射的方法诱导卵黄原蛋白的产生,而斑马鱼体型小,注射困难,血液量少,取血困难,无法获得足够的血浆用于卵黄原蛋白的纯化,这大大制约了斑马鱼卵黄原蛋白抗体的制备。

[0006] 目前,研究者对斑马鱼卵黄原蛋白的定性或定量检测多采用鲤鱼卵黄原蛋白抗体,由于卵黄原蛋白的蛋白质一级结构存在差异,且空间结构也会制约抗原的免疫原性,Watts 等 (2002) 认为大量的转译后修饰会影响鱼类卵黄原蛋白的三级结构,改变抗原决定簇的暴露情况,从而影响不同鱼种卵黄原蛋白之间的种间交叉反应敏感性,使得鱼类卵黄原蛋白抗体在用于其它鱼类卵黄原蛋白检测时受到限制。因此,为了准确反映环境雌激素的存在水平,对不同各类的鱼类,需要制备其相应的卵黄原蛋白抗体。斑马鱼卵黄原蛋白纯品已有国外公司出售,价格为 1500 元 ($5\mu\text{g}$),过于昂贵,并且如此小的剂量无法达到抗体制备要求。可见,建立斑马鱼卵黄原蛋白的纯化方法,将成为制备抗体与建立斑马鱼卵黄原蛋白检测的重要前提。

[0007] 中国专利 201210559592.1 提供了一种利用卵黄脂磷蛋白抗体定性检测鱼类卵黄原蛋白的试剂盒,具有显著的检测效果,然而该试剂盒只能对斑马鱼卵黄原蛋白进行定性检测。因此,有必要开发一种高效纯化斑马鱼卵黄原蛋白的方法,并制备出具有较高特异性和敏感性的抗斑马鱼卵黄原蛋白抗体,建立准确定量斑马鱼卵黄原蛋白的 ELISA 检测方法,从而准确评价化学物质对斑马鱼的环境雌激素效应。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争 ELISA 试剂盒及其检测方法与应用,以满足现有技术的上述要求。

[0009] 一种检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 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、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各 1 支,

[0010] 其特征在于该箱体还装有:斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支,兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支。

[0011] 所述的斑马鱼卵黄脂磷蛋白制备方法如下:将斑马鱼卵巢取出后称重,加入 3 倍体积 4°C 预冷的 PBS 缓冲液(内含 1mM PMSF, pH 7.4) 混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆, 8000g 离心 10 分钟,收集上清液;将上清液进行离子交换层析 (DEAE-Sepharose Fast Flow),用分别含 0.07M 、 0.1M 、 0.2M 和 1.0M NaCl 的 25mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 进行不连续洗脱。收集 0.2M 洗脱组分,装入截留分子量为 100kDa 的 Millipore 超滤离心管, 4°C 、 3000g 离心 30 分钟,加入 1ml PBS 缓冲液,收集截留在超滤离心管膜上的溶液;取 1ml 收集液加入 Sephadex G-200 层析柱,用 25mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 洗脱,收集第一个主洗脱峰,即为斑马鱼卵黄脂磷蛋白。

[0012] 所述的兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

[0013] (1) 斑马鱼卵黄原蛋白纯品的制备:采用水体暴露 17 β -雌二醇的方式诱导斑马鱼产生卵黄原蛋白,将斑马鱼置于 2L 的玻璃缸中,每缸放入 10 尾斑马鱼,17 β -雌二醇的暴露浓度为 200 μ g/L,每天全部换水,并重新加入相应的 17 β -雌二醇,早晚投喂饲料,水温 26 $^{\circ}$ C;7 天后将斑马鱼放入 50% 的酒精中,待斑马鱼麻醉后,取出称重,并加入 3 倍体积 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 缓冲液(内含 1mM PMSF, pH 7.5),在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4 $^{\circ}$ C、8000g 离心 10 分钟,收集上清液;利用权利要求 2 的方法从上清液中纯化获得斑马鱼卵黄原蛋白;

[0014] (2) 兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备:取 600 μ g 纯化的斑马鱼卵黄原蛋白,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 μ 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;第 5 次注射后于第 5 天从心脏取血,6000r/min 离心 20 分钟,收集上清,获得了兔抗斑马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清中加入 1/3 的对照阴性样品(雄鱼匀浆液),低温振荡 2h,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日离心取上清;向上清中加入等体积的 PBS 缓冲液;在冰浴条件下加入等体积饱和硫酸铵,0 $^{\circ}$ C 震荡 2h 后,低温离心(8000rpm, 15min),弃上清,沉淀用 10ml PBS 缓冲液溶解;用 0.45 微米孔径的滤膜过滤后,上 Hitrap Protein G 柱,以 PBS 缓冲液洗脱 10 个柱体积后,用 0.1M 甘氨酸(pH 2.7)洗脱,即获得兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体。

[0015] 上述检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒在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,包括:上述检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒在水体中雌激素类物质筛选与内分泌扰乱化学物质研究中的应用。上述检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒在食品中雌激素类物质筛选与内分泌扰乱化学物质研究中的应用,食品包括生食品(如蔬菜、新鲜生肉、冷冻生肉、新鲜水产品、冷冻水产品)、熟食品(如即食食品、熟肉制品、快餐等)。上述检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒在药品中雌激素类物质筛选与内分泌扰乱化学物质研究中的应用。

[0016] 利用上述的试剂盒进行内分泌扰乱化学物质检测的方法,其特征在于包括以下步骤:

[0017] 1) 用包被液稀释试剂盒中的斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品至 400ng/L,在空白 96 孔酶标板中加入 100 μ l/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。弃去孔内溶液,洗涤 3 次。

[0018] 2) 在 96 孔酶标板中加入封闭液,300 μ L/孔,室温下孵育 1 小时。弃去孔内溶液,洗涤 3 次。

[0019] 3) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液稀释了的斑马鱼卵黄脂磷蛋白标准品、待测样品 50 μ L/孔,并在每孔加入 50 μ L 用样品稀释液 1:5000 倍稀释的兔抗斑马鱼卵黄原蛋白抗体,37 $^{\circ}$ C 下孵育 2 小时。弃去孔内溶液,洗涤 5 次。

[0020] 待测样品包括之前所述的水体、食品、药品等。

[0021] 4) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液 1:2000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,100 μ L/孔,室温孵育 1 小时。弃去孔内溶液,洗涤 5 次。

[0022] 5) 在 96 孔酶标板中加入新鲜配制的显色液,100 μ L/孔,于室温暗处 37 $^{\circ}$ C 反应 10min。

[0023] 6) 待呈现明显的黄色后加终止剂, 50 μ L/孔。

[0024] 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。

[0025] 8) 计算: 以标准品浓度的对数值为横坐标, 吸光率为纵坐标, 绘制出标准曲线。吸光率公式为: $B_1/B_0(\%) = (OD-NSB)/(OD_0-NSB) \times 100$ 。 B_1 为标准品或样品 OD 值, B_0 为标准品 0 的 OD 值, NSB 为非特异性结合的 OD 值。本实验中 NSB 为测定 PBS 包被的 OD 值。根据样品的 OD 值计算其吸光率, 由标准曲线计算出相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

[0026] 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、方便地检测斑马鱼血浆中、整体匀浆液、肝脏组织和肝细胞培养液中的卵黄原蛋白, 其检测范围为 31.25 ~ 1000ng/ml, 为内分泌扰乱化学物质筛选、检测和生态环境风险评价提供了一个有效的手段。

[0027] 本发明的优点

[0028] 目前, 斑马鱼 Vtg ELISA 试剂盒多为 Biosense 公司出售, 报价为 13750 元, 过于昂贵; 此外, 国内外也多采用异源性 (鲤鱼) 抗体用于斑马鱼 Vtg 的测定。研究表明, 异源性抗体达不到同源性抗体的检测敏感性。斑马鱼 Vtg 检测的难度主要在于斑马鱼 Vtg 的分离纯化。本发明利用 200 μ g/L 17 β -雌二醇水体暴露 7 天的方法即可诱导雄性斑马鱼产生足量的 Vtg, 极大地降低了诱导时间和工作量。本发明建立了纯化斑马鱼 Vtg 的新方案, 可以在一天之内纯化出斑马鱼 Vtg, 大大减少了工作量, 并且所采用的设备价格较为低廉, 可在一般实验室内开展纯化工作。此外, 由于鱼类 Vtg 在分离纯化过程中容易降解, 且温度对降解的影响最为显著, 甚至可能导致 Vtg 丧失生物学活性; 样品反复冻融也会增加 Vtg 降解程度, 为了避免 Vtg 降解对检测结果造成的影响, 本发明利用更加稳定且与 Vtg 具有相同免疫原性的卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, Lv) 作为定量检测的标准品。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、方便地定性检测斑马鱼在不同污染物暴露下体内 Vtg 的生成水平, 为评价化学物质的环境雌激素效应提供了快捷的手段。

附图说明

[0029] 图 1 为本发明的试剂盒对斑马鱼卵黄脂磷蛋白标准品的检测结果;

[0030] 图 2 为本发明的试剂盒对 17 β -雌二醇诱导雄鱼与对照组雄性斑马鱼匀浆液的检测结果。

具体实施方式:

[0031] 一种检测斑马鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒, 包括一个箱体, 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、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各 1 支,

[0032] 其特征在于该箱体还装有: 斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支, 兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体 1 支。

[0033] 制备检测斑马鱼卵黄原蛋白的夹心 ELISA 试剂盒包括以下步骤:

[0034] (一) 制备斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品;

[0035] (二) 制备兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体；

[0036] 其中,所述(一)制备斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品方法如下：

[0037] 将斑马鱼卵巢取出后称重,加入3倍体积4℃预冷的PBS缓冲液(内含1mM PMSF, pH 7.4)混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,8000g离心10分钟,收集上清液;将上清液进行离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow),用分别含0.07M、0.1M、0.2M和1.0M NaCl的25mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.5)进行不连续洗脱。收集0.2M洗脱组分,装入截留分子量为100kDa的Millipore超滤离心管,4℃、3000g离心30分钟,加入1ml PBS缓冲液,收集截留在超滤离心管膜上的溶液;取1ml收集液加入Sephadex G-200层析柱,用25mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)洗脱,收集第一个主洗脱峰,即为斑马鱼卵黄脂磷蛋白。

[0038] 所述(二)制备兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体方法如下：

[0039] (1) 斑马鱼卵黄原蛋白纯品的制备:采用水体暴露17β-雌二醇的方式诱导斑马鱼产生卵黄原蛋白,将斑马鱼置于2L的玻璃缸中,每缸放入10尾斑马鱼,17β-雌二醇的暴露浓度为200 μg/L,每天全部换水,并重新加入相应的17β-雌二醇,早晚投喂饲料,水温26℃;7天后将斑马鱼放入50%的酒精中,待斑马鱼麻醉后,取出称重,并加入3倍体积4℃预冷的PBS缓冲液(内含1mM PMSF, pH 7.5),在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃、8000g离心10分钟,收集上清液;利用权利要求2的方法从上清液中纯化获得斑马鱼卵黄原蛋白;

[0040] (2) 兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体的制备:取600 μg纯化的斑马鱼卵黄原蛋白,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 μg/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;第5次注射后于第5天从心脏取血,6000r/min离心20分钟,收集上清,获得了兔抗斑马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清中加入1/3的对照阴性样品(雄鱼匀浆液),低温振荡2h,4℃过夜,次日离心取上清;向上清中加入等体积的PBS缓冲液;在冰浴条件下加入等体积饱和硫酸铵,0℃震荡2h后,低温离心(8000rpm, 15min),弃上清,沉淀用10ml PBS缓冲液溶解;用0.45微米孔径的滤膜过滤后,上Hitrap Protein G柱,以PBS缓冲液洗脱10个柱体积后,用0.1M甘氨酸(pH 2.7)洗脱,即获得兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体。

[0041] 最后,将制备的斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支、兔抗斑马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、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗1支装入盒体内,构成本发明的试剂盒。其具体组成如下：

[0042] 1) 空白96孔酶标板1块；

[0043] 2) 斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支,使用前用样品稀释液稀释到所需浓度；

[0044] 3) 兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体1支,使用前用包被液按1:5000的体积比稀释；

[0045] 4) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支,使用前用样品稀释液按1:2000的体积比稀释；

[0046] 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 Na_2CO_3 , 2.93g 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 NaCl , 0.2g KCl , 2.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2g KH_2PO_4 , 0.5ml 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 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 ;终止剂为 2M 的 H_2SO_4 水溶液。

[0047] 本发明的检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争 ELISA 试剂盒可用于内分泌扰乱化学物质的检测。使用时分为以下步骤 :

[0048] 1) 用包被液稀释试剂盒中的斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品至 400ng/L, 在空白 96 孔酶标板中加入 100 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。弃去孔内溶液, 洗涤 3 次。

[0049] 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。

[0050] 3) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液稀释了的斑马鱼卵黄脂磷蛋白标准品、待测样品 50 μL /孔, 并在每孔加入 50 μL 用样品稀释液 1:5000 倍稀释的兔抗斑马鱼卵黄原蛋白抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 5 次。

[0051] 4) 在 96 孔酶标板中加入用样品稀释液 1:2000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗, 100 μL /孔, 室温孵育 1 小时。弃去孔内溶液, 洗涤 5 次。

[0052] 5) 在 96 孔酶标板中加入新鲜配制的显色液, 100 μL /孔, 于室温暗处 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10min。

[0053] 6) 待呈现明显的黄色后加终止剂, 50 μL /孔。

[0054] 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。

[0055] 8) 计算 :以标准品浓度的对数值为横坐标, 吸光率为纵坐标, 绘制出标准曲线。吸光率公式为 : $B_1/B_0(\%) = (\text{OD}-\text{NSB})/(\text{OD}_0-\text{NSB}) \times 100$ 。 B_1 为标准品或样品 OD 值, B_0 为标准品 0 的 OD 值, NSB 为非特异性结合的 OD 值。本实验中 NSB 为测定 PBS 包被的 OD 值。根据样品的 OD 值计算其吸光率, 由标准曲线计算出相应的浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

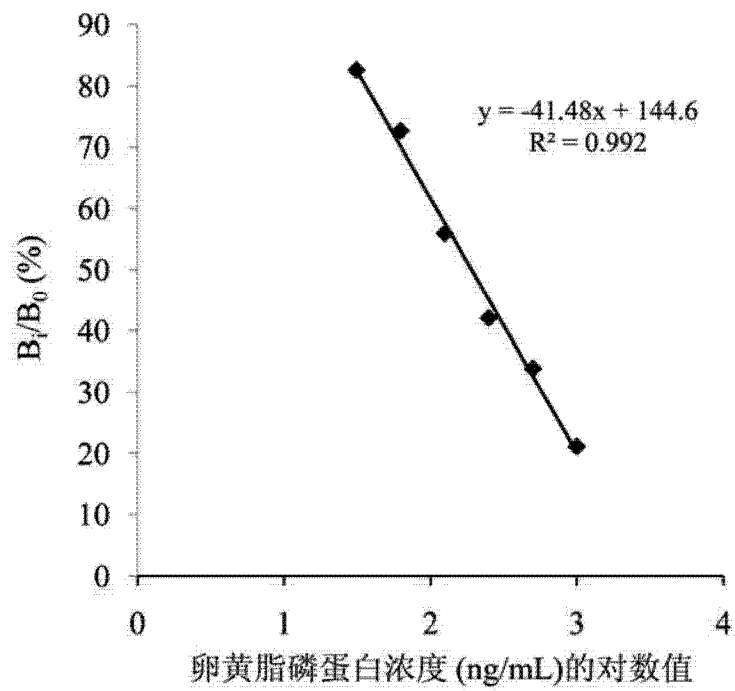


图 1

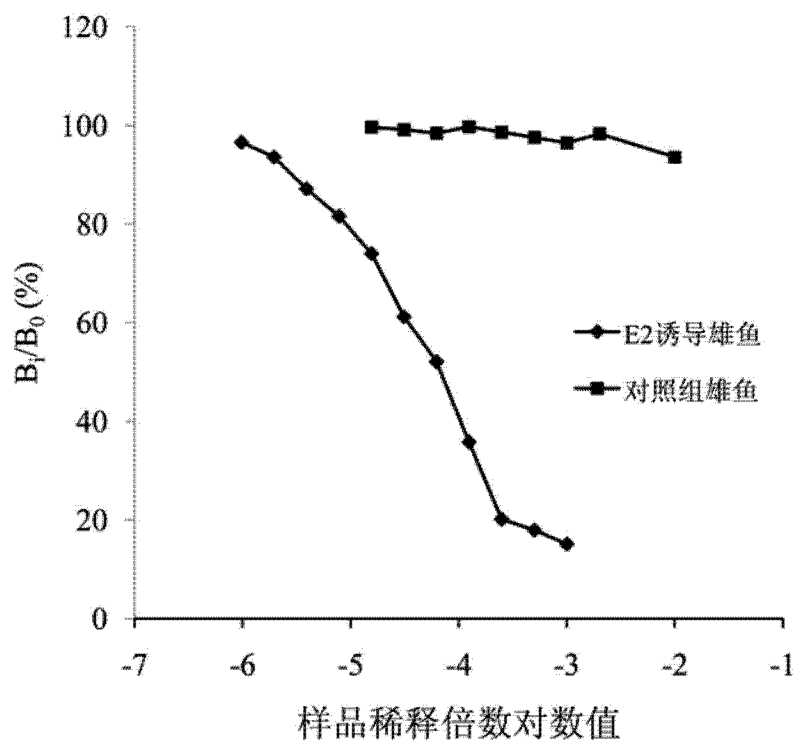


图 2

专利名称(译)	斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争ELISA试剂盒及其检测方法与应用		
公开(公告)号	CN104569423A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201410752194.0	申请日	2014-12-09
[标]申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国海洋大学		
[标]发明人	汝少国 王军 王蔚 田华		
发明人	汝少国 王军 王蔚 田华		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68		
代理人(译)	张中南 邱岳		
其他公开文献	CN104569423B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

斑马鱼卵黄原蛋白间接竞争ELISA试剂盒及其检测方法与应用。通过两步层析与超滤相结合的方法从斑马鱼卵巢与17β-雌二醇暴露后的斑马鱼体内中分别纯化出卵黄脂磷蛋白与卵黄原蛋白，制备兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体；将斑马鱼卵黄脂磷蛋白纯品、兔抗斑马鱼卵黄原蛋白多克隆抗体、空白96孔酶标板1块、以及包被液、洗涤液、封闭液、样品稀释液、显色液、终止液和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗各1支共同装入盒体，得到检测斑马鱼卵黄原蛋白的间接竞争ELISA试剂盒。本发明的试剂盒可以应用于环境类雌激素物质的调查中，能够灵敏、准确、方便的定量检测斑马鱼血浆、整体匀浆液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白，检测范围为31.25~1000ng/mL，为斑马鱼在内分泌干扰物检测领域的应用提供了重要工具。

