

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/531

G01N 33/543 G01N 33/558



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02115727.8

[45] 授权公告日 2005 年 2 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1187616C

[22] 申请日 2002.4.18 [21] 申请号 02115727.8

[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 杨方星 梁 勇
审查员 颜 丛

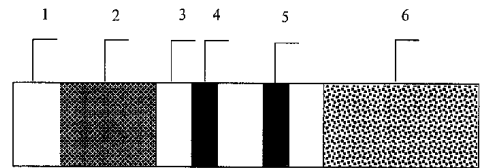
[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所
代理人 王敏锋

权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 类雌激素毒性快速检测试片的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，该试片能够实现对类雌激素毒性的快速在线检测，它包括下列步骤：首先是对抗原的诱导和分离纯化，离心获得血清，将 VTG 蛋白溶液脱盐冻干成为冻干粉；其次是抗体的诱导，获得抗血清；再是抗体的分离纯化，分离后的卵黄蛋白原抗体除盐后冻干；第四是胶体金-抗体结合物的制备；第五是胶体金-抗体结合物的吸附；第六是抗原和抗体的固化；第七是试片的装配。本发明方法简单，操作方便，试片体积小，便于携带和使用，适合环保、科研、商检及食品水产等单位进行类雌激素污染检测。



ISSN 1008-4274

1、一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，其步骤如下：

A、抗原的诱导和分离纯化，配制 17α -乙炔基雌二醇溶液，将 100mg 17α -乙炔基雌二醇先溶于 5mL 丙酮中，再转溶于 10mL 豆油，丙酮用氮气吹干，腹腔注射，5mg/kg，暴露 5—7 天，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，柱子用 0.025mol/L Tris · HCl，pH 7.5 平衡，加样 2mL，梯度洗脱，收集洗脱液，将卵黄蛋白原蛋白溶液脱盐冻干成为冻干粉；

B、抗体的诱导，免疫兔获得卵黄蛋白原抗体，在兔皮内注射 1mg 卵黄蛋白原蛋白，1mg 蛋白溶于 1mL 水中，再加入 1mL 佐剂，第 28、42、56 天各加强免疫一次，70 天颈动脉放血，4℃ 离心获得抗血清；

C、抗体的分离纯化，抗血清通过亲和层析柱，填料为 Protein A Sepharose CL-4B，分离后的卵黄蛋白原抗体除盐后冻干；

D、胶体金-抗体结合物的制备，首先是待标抗体稳定量的确定，用光电比色法或目测法；其次是抗体的标记，在电磁搅拌下，将抗体蛋白质溶液加入胶体金溶液中，加入蛋白质时应逐滴加入；再是浓缩，用超滤离心管浓缩到原体积的 1/10 量；

E、胶体金-抗体结合物的吸附，将玻璃纤维膜浸没在浓缩过的胶体金标记抗体的溶液中，待完全浸透后取出，晾干；

F、试片的装配，在一个不吸水的底衬上，依次粘贴吸水材料（1）、玻璃纤维膜（2）、硝酸纤维膜（3）、吸水材料（6），硝酸纤维膜（3）上分别固定了抗体（4）和抗原（5）。

2、根据权利要求 1 所述的一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，其特征在于抗体的分离纯化，其步骤是：

(a)、20 倍柱体积的 0.1mol/L Tris · HCl，pH 8.0 平衡柱子；

(b)、上抗血清样品；

(c)、依次用 10 倍柱体积的 100mmol/L Tris · HCl，pH 8.0 和 10 倍柱体积的 10mmol/L Tris · HCl，pH 8.0 洗柱；

(d)、加入 5 倍柱体积的 100mmol/L Gly，pH 3.0，收集样品，每管预先加入 200 μ L 1mol/L Tris · HCl，pH 8.0，每管收集 0.5mL；

(e)、在 280nm 处测定收集样品的吸光值以检出 IgG 组分，流出组分中 IgG 的浓度为 1mg/mL；

(f)、10 倍柱体积的 100mmol/L Tris · HCl, pH 8.0 调节柱床。

类雌激素毒性快速检测试片的制备方法

技术领域

本发明涉及一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，该方法制备的检测试片能够实现对类雌激素毒性的快速在线检测，以便确定类雌激素的生态毒理学效应，也可以作为环保、科研、商检及食品水产等单位进行类雌激素污染的检测和研究。

背景技术

雌激素是人和动物体内重要的化学信使之一，对生长发育、内分泌功能、生殖功能起着重要的作用。现已发现，水环境中存在着的一类具有雌激素活性，能够模拟雌激素功能的环境化学物质，称之为类雌激素。这类物质主要包括避孕药中的合成雌激素，植物产生的某些天然物质和一些人工合成的环境污染物（如多氯联苯、DDT、邻苯二甲酸酯、烷基酚等）。由于这些物质能够影响机体正常的激素代谢，干扰内分泌功能，导致发育生殖异常，因而越来越受到人们的关注和重视。

由于类雌激素的种类繁多，化学结构差异很大，很难用某个通用的化学结构式表示。因而，很难使用化学仪器来鉴别。由于化学分析不能给出类雌激素的毒性效应，仅能检测已知类雌激素的种类和浓度，这样，即使检测出某些类雌激素具有相同的环境浓度，但也无法区分它们的雌激素活性的大小。因此，目前对类雌激素毒性的检测主要是通过生物筛选来进行。生物筛选是根据化合物对生物的雌激素效应，来确定所测化合物是否为类雌激素，其主要方法有：

动物实验。通过测定类雌激素对性成熟前实验动物（如大鼠和小鼠）子宫生长的促进作用来评价其雌激素活性，评价标准有子宫湿重和子宫湿重与体重之比。在鱼中则为性腺与体重之比。这种方法是经典的类雌激素毒性检测方法，它能够检测多种雌激素，灵敏度较高，操作也较方便，但受到实验本身所选指标的限制，存在较大的实验误差。

细胞培养。利用对雌激素敏感的细胞系检测类雌激素活性。所用的细胞系有人乳腺癌 MCF7、T47D 细胞和 ZR-75-1 细胞、Hela 细胞、大鼠子宫原代细胞、大鼠垂体原代细胞、鼠淋巴细胞经基因转染的 LeC-9 细胞等。环境化合物的雌激素活性可以通过细胞的增殖试验检验；其活性也可以通过雌激素作用元件调控的基因表达和雌激素所诱导的孕激素生成来加以检测。目前使用最为广泛的是 MCF7 细胞系，它的好处在于能反映对人体的作用，并且灵敏度较高。在用细胞

培养进行类雌激素毒性检测时，假阳性或假阴性的比例较高，这是该方法主要的不足之处，也是在使用这种方法时必须注意的问题。

雌激素受体结合试验。体外测定类雌激素与雌激素受体的特异性亲和力来检测其活性大小。雌激素需与受体蛋白结合为复合物，才能作用于相应的靶器官产生作用。受体亲和力与雌激素活性之间具有明显的相关性，但激素与受体的结合并不一定激活雌激素受体和激素控制的基因表达。类雌激素与受体的亲和力大小可以通过对氘标记雌二醇的竞争性抑制反应来测定。该法由于需要使用同位素标记物，所以实验操作具有一定的危害性。

卵黄蛋白原（Vitellogenin, VTG）诱导。卵黄蛋白原是卵生脊椎动物中卵黄蛋白的前体，通常只有性成熟的雌鱼中才能产生。但在类雌激素存在时，性成熟的雄鱼和幼鱼体内也能产生卵黄蛋白原，通过检测性成熟的雄鱼和幼鱼体内是否存在卵黄蛋白原可以确定环境化合物是否具有雌激素效应。目前检测卵黄蛋白原主要有 ELISA 和 Western Blotting 两种方法。该法最大的不足是由于卵黄蛋白原是一种种特异性蛋白，因而，检测不同鱼体内的卵黄蛋白原时，需要有相应的卵黄蛋白原和卵黄蛋白原抗体。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，方法简单可靠，操作简便，解决了类雌激素毒性的快速在线检测问题。

为了达到上述目的，本发明采用以下技术措施：卵黄蛋白原通常情况下只有性成熟的雌鱼中才能产生，虽然，性成熟的雄鱼和幼鱼体内也存在卵黄蛋白原的基因，但在正常情况下并不表达。当环境中存在类雌激素时，性成熟的雄鱼和幼鱼体内的卵黄蛋白原基因能够被诱导表达，在体内合成卵黄蛋白原。因此，通过检测性成熟的雄鱼和幼鱼体内是否存在卵黄蛋白原就可以确定其生活的环境是否受到类雌激素的污染。

检测试片以免疫层析为原理，能够定性或半定量检测卵黄蛋白原。检测试片从下到上依次为吸水材料、玻璃纤维膜、硝酸纤维膜、吸水材料。玻璃纤维膜上吸附了胶体金标记的卵黄蛋白原抗体，硝酸纤维膜上依次固定了卵黄蛋白原抗体和卵黄蛋白原。鱼血清样品从下至上层析。如果样品中含有卵黄蛋白原，则与从玻璃纤维膜上复溶下来的胶体金标记的卵黄蛋白原抗体结合，形成抗原抗体复合物。复合物继续向上层析，与硝酸纤维膜上固定的卵黄蛋白原抗体结合显色，而未与卵黄蛋白原结合的胶体金标记卵黄蛋白原抗体则再继续向上层析与卵黄蛋白原结合显色。即样品中含有卵黄蛋白原时，检测试片显示两条红线，样品中不含卵黄蛋白原时，检测试片显示一条红线。

本发明与现有技术相比，具有以下优点和效果：检测试片建立在抗原和抗体的结合反应基础之上，因而具有很强的专一性和可靠性，能够定性或半定量检测

样品中卵黄蛋白原的存在，从而确定类雌激素是否存在。检测试片体积很小，便于携带和使用。使用时仅需 100 μ L 左右的鱼血清，整个分析过程可在 30 分钟内完成，不需要特殊仪器和试剂，操作人员也无需特殊培训，非常适合野外的在线检测。可以作为环保、科研、商检及食品水产等单位进行类雌激素污染检测的手段之一，也可以作为确定类雌激素的初筛方法，与实验室精确的化学分析相辅相成。

附图说明

图 1 为一种类雌激素毒性快速检测试片的结构示意图。

具体实施方式

下面结合附图对本发明作进一步详细描述：

实施例

(1) 抗原的诱导和分离纯化

配制 17 α -乙炔基雌二醇 (17 α -ethinylestradiol, EE₂) 溶液：将 100mg17 α -乙炔基雌二醇先溶于 5mL 丙酮中，再转溶于 10mL 豆油，丙酮用氮气吹干。

腹腔注射，5mg/kg。暴露 5—7 天。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。柱子用 0.025mol/L Tris · HCl, pH 7.5 平衡，加样 2mL，梯度洗脱（左：0.025mol/L Tris · HCl, pH 7.5, 0.5mol/L NaCl；右：0.025mol/L Tris · HCl, pH 7.5）。部分收集器收集洗脱液，以电泳确定各管中是否含有卵黄蛋白原。将卵黄蛋白原蛋白溶液脱盐冻干成为冻干粉。

(2) 抗体的诱导

免疫新西兰大白兔获得卵黄蛋白原抗体。在兔子皮内注射 1mg 卵黄蛋白原蛋白，皮内多点注射。1mg 蛋白溶于 1mL 水中，再加入 1mL 佐剂。

第 28、42、56 天各加强免疫一次，剂量与第一次相同。

70 天颈动脉放血，4℃ 离心获得抗血清。

(3) 抗体的分离纯化

抗血清通过亲和层析柱，填料为 Protein A Sepharose CL-4B。

(a)、20 倍柱体积的 0.1mol/L Tris · HCl, pH 8.0 平衡柱子

(b)、上抗血清样品

(c)、依次用 10 倍柱体积的 100mmol/L Tris · HCl, pH 8.0 和 10 倍柱体积的 10mmol/L Tris · HCl, pH 8.0 洗柱

(d)、加入 5 倍柱体积的 100mmol/L Gly, pH 3.0，收集样品，每管预先加入 200 μ L 1mol/L Tris · HCl, pH 8.0，每管收集 0.5mL。

(e)、在 280nm 处测定收集样品的吸光值以检出 IgG 组分，流出组分中 IgG

的浓度至少为 1mg/mL (OD₂₈₀ 为 1.33)

(f)、10 倍柱体积的 100mmol/L Tris · HCl, pH 8.0 调节柱床。

分离后的卵黄蛋白原抗体除盐后冻干。

(4) 胶体金-抗体结合物的制备

(a)、待标抗体的准备。将卵黄蛋白原抗体溶于蒸馏水配成蛋白溶液。胶体金 pH 调至 7.4-7.6, 用 0.1mol/L K₂CO₃ 溶液上调, 用 0.1mol/L HCl 溶液下调。

(b)、待标抗体最适稳定量的确定。

待标抗体最适稳定量的确定可用光电比色法或目测法。

光电比色法: 制备一系列不同浓度的等体积蛋白质溶液 (1mL), 分别加入 5mL 胶体金中, 迅速混匀, 然后, 各加入 1mL 10% NaCl 溶液, 摇匀, 静置 5min 后测各管。根据胶体金颗粒的大小, OD 在 520~580nm 之间测定, 以 OD 值为纵坐标, 蛋白质用量为横坐标作一曲线, 取曲线最先与横轴相接近的那一点处的蛋白质用量为最适稳定量。

目测法: 以目测法确定胶体金与待标记蛋白质用量比例, 将标记的蛋白质逐级稀释后 (由 5μg~45μg 另设对照管), 各取等体积顺序加入一系列装有 1mL 胶体金的试管中, 5min 后, 在上述各管内分别加入 0.1mL 10% 氯化钠, 混匀静置 2h 以上观察结果。小于 5nm 颗粒的胶体金溶液, 每个管内应加入 5μL 33% 的双氧水, 否则有不变蓝色及聚沉现象。未加蛋白及加入蛋白量不足以稳定胶体金的试管, 即呈现由红变蓝的聚沉现象, 而加入蛋白量达到或超过最低稳定量的试管则胶体金的红颜色不变。其中含蛋白量最低的试管即含稳定 1mL 胶体金的必须蛋白量。在此基础上再加上 20% 即为稳定所需蛋白质的实际用量。

(c)、抗体的标记。

根据用以标记的胶体金的总量计算出所需要的待标记抗体蛋白质的总量。

在电磁搅拌 (使用玻璃外壳搅拌子) 下, 将抗体蛋白质溶液加入胶体金溶液中 (pH 已调至 PI 超过 0.5pH), 加入蛋白质时应逐滴加入, 1mg 的蛋白质大约 5min 加完。

在磁性搅拌下加入 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 使其终浓度为 1%。

(d)、浓缩。用超滤离心管浓缩到原体积的 1/10 量。

(5) 胶体金-抗体结合物的吸附

将裁剪好尺寸的玻璃纤维膜浸没在浓缩过的胶体金标记抗体的溶液中, 待完全浸透后取出, 自然晾干。

(6) 抗原和抗体的固化

将抗体和抗原的冻干粉分别配成蛋白溶液。再将抗原和抗体分别固定在硝酸

纤维膜的控制线和检测线上，自然晾干。硝酸纤维膜的其它区域用牛奶中的蛋白质封闭后，取出自然晾干。

(7) 试片的装配

所有部件均装配在一个不吸水的底衬上，从左到右依次在底衬上粘贴吸水材料 1、玻璃纤维膜 2、硝酸纤维膜 3、吸水材料 6。玻璃纤维膜上吸附了胶体金-抗体结合物，硝酸纤维膜上分别固定了抗体 4 和抗原 5。样品在试片上的层析由左向右进行，即使用时应将试片的左端朝下插在样品中，但样品液面不能超过玻璃纤维膜。

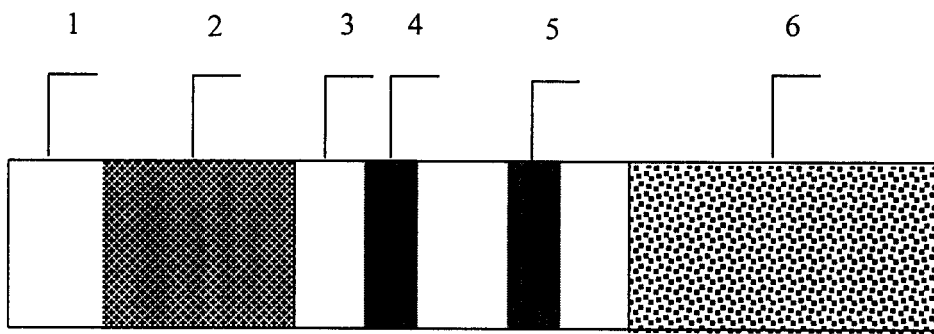


图 1

专利名称(译)	类雌激素毒性快速检测试片的制备方法		
公开(公告)号	CN1187616C	公开(公告)日	2005-02-02
申请号	CN02115727.8	申请日	2002-04-18
[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 杨方星 梁勇		
发明人	徐盈 杨方星 梁勇		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1451965A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种类雌激素毒性快速检测试片的制备方法，该试片能够实现对抗原的快速在线检测，它包括下列步骤：首先是对抗原的诱导和分离纯化，离心获得血清，将VTG蛋白溶液脱盐冻干成为冻干粉；其次是抗体的诱导，获得抗血清；再是抗体的分离纯化，分离后的卵黄蛋白原抗体除盐后冻干；第四是胶体金-抗体结合物的制备；第五是胶体金-抗体结合物的吸附；第六是抗原和抗体的固化；第七是试片的装配。本发明方法简单，操作方便，试片体积小，便于携带和使用，适合环保、科研、商检及食品水产等单位进行类雌激素污染检测。

