



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113009127 A

(43)申请公布日 2021.06.22

(21)申请号 201911316164.4

(22)申请日 2019.12.19

(71)申请人 北京中医药大学

地址 102488 北京市房山区良乡大学城北  
京中医药大学良乡校区

(72)发明人 吴志生 郑燕飞 马丽娟 李博悻

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所  
11430

代理人 范盈

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

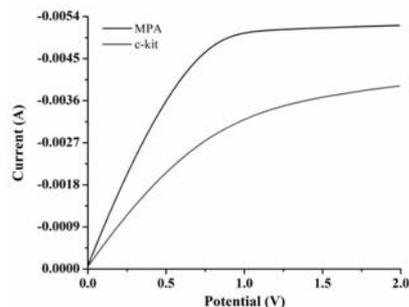
权利要求书2页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

一种生物传感器联合蛋白免疫反应在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种生物传感器联合蛋白免疫反应在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,其特征在于,包括AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器和蛋白免疫反应;通过构建的AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,开展五味子甲素治疗少弱精子症信号通路体外检测实验,进一步联合蛋白免疫反应,开展五味子甲素治疗少弱精子症信号体内通路检测实验,发现五味子甲素是通过调节SCF/c-kit通路发挥治疗少、弱精子症的作用;该检测方法特异性强,检测浓度低至pg/pM级,检测范围涵盖五个数量级,具有高灵敏度和强专属性。



1. 一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,其特征在在于,包括AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器和蛋白免疫反应,治疗的信号通路包括SCF/c-kit通路。

2. 根据权利要求1中所述的一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,其特征在在于,AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中应用的具体步骤如下:

(1) AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器的制备:

a. 将干净的AlGaAs/GaAs HEMT器件置于含巯基试剂中,于室温下浸泡,在AlGaAs/GaAs HEMT器件表面生成Au-S键,生成自组装单层;

b. 用去离子水洗去AlGaAs/GaAs HEMT器件表面的巯基试剂,加入羧基活化剂,生成稳定的胺类活化产物;

c. 用磷酸盐缓冲液清洗AlGaAs/GaAs HEMT器件,加入络氨酸激酶c-kit或重组人干细胞因子SCF,反应完成,即得c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器或SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器;

(2) AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在黄精赞育胶囊有效成分治疗少、弱精子症信号通路检测中的应用:

a. 根据(1)所述方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,依次加入浓度由低到高的重组人干细胞因子SCF溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度;以SCF蛋白溶液浓度的对数为横坐标,以电流变化相对值为纵坐标,进行线性拟合,进一步根据公式计算SCF与c-kit相互作用强度;

b. 根据(1)所述方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT和SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,分别向两个传感器中依次加入浓度由低到高的五味子甲素标准品溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度;以五味子甲素标准品溶液浓度的对数为横坐标,以电流变化相对值为纵坐标,进行线性拟合,进一步根据公式计算五味子甲素与c-kit和SCF相互作用强度;

c. 根据(1)所述方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,依次加入浓度由低到高的重组人干细胞因子SCF和五味子甲素的混合溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度,考察五味子甲素对SCF/c-kit相互作用强度的影响,分析五味子甲素调节SCF/c-kit作用机制。

3. 权利要求1-2中任一所述的一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,其特征在在于,步骤(1) b中的羧基活化剂为碳酰二亚胺盐酸盐和N-羟基丁二酰亚胺,活化时间为15-30min,修饰c-kit或SCF的反应温度为4℃,反应时间不低于2小时。

4. 根据权利要求1所述的一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,其特征在在于,蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中应用的具体步骤如下:

(1) 构建少、弱精子症动物模型,分空白对照组,五味子甲素高中低三个剂量组和左卡尼汀组给药,所有大鼠最后一次给药后,取静脉血后处死动物,取睾丸组织冻存;

(2) 切取睾丸组织,剪碎,加入磷酸盐缓冲液,于4℃离心,弃去上清液,加入含有蛋白酶

抑制剂的RIPA裂解液裂解睾丸组织,4℃离心取上清液备用;

(3) 制作睾丸组织石蜡切片,通过免疫组织化学实验方法,观察各组大鼠睾丸组织蛋白表达情况;

(4) 以牛血清白蛋白溶液为标准液,采用酶标仪测定SCF抗体和c-kit抗体的蛋白浓度;采用电泳技术分离蛋白,经制胶、电泳、转膜、染膜及封闭等步骤制备PVDF膜,加入信号通路涉及的蛋白的二抗溶液反应,通过Western Blot,结合数码凝胶图像分析系统分析蛋白表达情况;

(5) 结合基于睾丸组织免疫化学反应及基于Western Blot的蛋白表达结果,分析五味子甲素介导SCF/c-kit通路治疗少、弱精子症的机制。

## 一种生物传感器联合蛋白免疫反应在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及中药领域,具体涉及一种生物传感器联合蛋白免疫反应在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用。

### 背景技术

[0002] 研究表明全世界大约5%的异性夫妇有不孕的问题。然而,更多的夫妇经历了至少一年的非自愿无子女:估计在12%到28%之间。男性不孕症占不孕症病例的20%-30%,据调查发现,近年来男性不育的发生率显著增高,最常见的原因是精液缺乏,其中由少、弱精子症导致的男性不育症高达60%,严重影响人们的家庭和谐和生活质量,是全球亟待攻克的关键难题。

[0003] 针对少、弱精子症,现代医学虽开展了大量研究,但目前尚缺乏疗效确切的治疗药物。中医药基于整体观和辨证论治思想治疗男性不育症历史悠久,疗效确切。中医男科学奠基人之一王琦院士提出少、弱精子症的核心病机为“肾虚挟湿热瘀毒虫”,并根据此病机提出了“补肾益精、清热利湿、活血化瘀”的治疗原则,基于此创研了我国第一个专门治疗男性不育症的生精方药“黄精赞育胶囊”。临床结果显示,该药能增加精子数量,提高精子活力,对于少、弱精子症引起的男性不育症疗效显著。前期研究表明,其有效成分五味子甲素具有提高精子活力的作用,有望开发低毒高效的生精药物,但其作用机制仍待进一步研究。

[0004] 目前常用于检测信号通路的方法为蛋白免疫反应方法,但是单独使用该方法缺乏对作用机制的直观表征。高电子迁移率晶体管(High Electron Mobility Transistor, HEMT)作为第三代电化学型器件,以其更高的灵敏度和更强的专属性为分子间相互作用机制的识别提供了关键的前沿技术支撑。然而,联合生物传感器技术和蛋白免疫反应方法用于检测五味子甲素提高少、弱精子症样本精子活力的作用机制的研究仍为空白。

### 发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题在于,针对单独体外实验缺乏可靠性,单独体内实验缺乏作用机制的直观表征问题,提供一种结合高灵敏度和强专属性的HEMT生物传感器的体外实验联合基于蛋白免疫反应方法的体内验证实验方法,解析五味子甲素提高少、弱精子症样本精子活力的作用机制。

[0006] 本发明提供一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,首先提供一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中应用,具体技术方案如下:

[0007] (1)构建c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器和SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,具体制备步骤如下:

[0008] a将干净的AlGaAs/GaAs HEMT器件置于巯基试剂中,于室温下浸泡24小时,在AlGaAs/GaAs HEMT器件表面生成Au-S键,生成自组装单层;

[0009] b. 用去离子水洗去AlGaAs/GaAs HEMT器件表面的巯基试剂,加入碳酰二亚胺盐酸盐和N-羟基丁二酰亚胺混合液,反应15分钟,生成稳定的胺类活化产物以活化羧基;

[0010] c. 用PBS清洗AlGaAs/GaAs HEMT器件,加入络氨酸激酶(c-kit)或重组人干细胞因子(SCF),于4℃下反应2小时,即得c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器或SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器;

[0011] (2) 基于AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器的五味子甲素治疗少弱精子症通路的检测方法,具体检测步骤如下:

[0012] a. 制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,由低到高依次加入浓度范围的重组人干细胞因子SCF的PBS溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度 $I_{DS}$ ;以SCF蛋白溶液浓度的对数 $Lg$ 为横坐标,以电流变化相对值 $(I-I_0)/I_0$ 为纵坐标,进行线性拟合,确定c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器用于检测 SCF蛋白溶液的浓度范围;以SCF蛋白溶液的浓度为横坐标,以(2)中确定浓度范围的浓度/电流变化为纵坐标,进行线性拟合,求得SCF与c-kit相互作用的解离常数;

[0013] b. 制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,向传感器中依次加入浓度由低到高的五味子甲素标准品溶液(浓度范围为0.1pM-1.0mM),采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度 $I_{DS}$ ;以五味子甲素标准品溶液浓度的对数为横坐标,以电流变化相对值为纵坐标,进行线性拟合,确定五味子甲素标准品溶液浓度的检测范围;以五味子甲素标准品溶液的浓度为横坐标,以确定检测范围的浓度/电流变化为纵坐标,进行线性拟合,根据公式计算五味子甲素与c-kit相互作用强度;

[0014] c. 制备SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,按b同法分析五味子甲素与 SCF相互作用情况;

[0015] d. 制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,依次加入浓度由低到高的重组人干细胞因子SCF和五味子甲素的混合溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度 $I_{DS}$ ,考察五味子甲素对SCF/c-kit相互作用的影响。

[0016] 本发明进一步提供一种蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中应用,具体步骤如下:

[0017] (1) 构建少、弱精子症动物模型,分空白对照组,五味子甲素高中低三个剂量组和左卡尼汀组给药,所有大鼠最后一次给药后,取静脉血后处死动物,取睾丸组织冻存;

[0018] (2) 取睾丸组织制成石蜡切片,结合免疫化学反应方法,观察睾丸组织中SCF 和c-kit蛋白表达情况;

[0019] (3) 切取睾丸组织,剪碎,加入PBS缓冲液,于4℃离心,弃去上清液,加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解睾丸组织,4℃离心取上清液备用;以牛血清白蛋白溶液为标准液,采用酶标仪测定SCF抗体和c-kit抗体的蛋白浓度,调整样本浓度,水浴加热使蛋白充分变性;

[0020] (4) 采用电泳分离蛋白,通过制胶、电泳、转膜、染膜及封闭等步骤,制备 PVDF膜,加入SCF和c-kit二抗溶液反应,通过western blot反应,结合数码凝胶图像分析系统分析蛋白含量;

[0021] (5) 结合组织切片结果和western blot结果,分析五味子甲素介导SCF/c-kit 通路治疗少弱精子症的机制。

[0022] 有益结果:

[0023] 本发明提供一种AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器联合蛋白免疫反应方法在检测五味子甲素治疗少弱精子症信号通路中的应用,首先采用自主研发的 AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器开展了体外五味子甲素治疗少弱精子症信号通路的检测实验,发现五味子甲素能够通过作用于SCF/c-kit通路,检测范围达到pg/pM级,专属性强,灵敏度高,在体外直观反映出五味子甲素与SCF/c-kit通路中蛋白的相互作用;进一步,构建了少弱精子症大鼠模型,并采用蛋白免疫反应方法,开展了五味子甲素治疗少弱精子症信号通路的体内验证实验,结果表明五味子甲素确实能够改善少弱精子症动物模型的睾丸组织结构,提高睾丸组织中 SCF蛋白的含量,同时降低c-kit蛋白的含量。基于AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器的五味子甲素治疗少弱精子症信号通路体外检测实验和基于蛋白免疫反应的五味子甲素治疗少弱精子症信号通路体内验证实验,克服了单独体外实验缺乏可靠性和单独体内实验缺乏作用机制的直观表征的技术问题,为五味子甲素治疗少弱精子症信号通路的检测提供检测方法指导。

## 附图说明

[0024] 图1 c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器蛋白修饰结果。

[0025] 图2 (a) 不同浓度SCF与c-kit结合的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号变化; (b) 不同浓度SCF 与c-kit结合的线性拟合结果。

[0026] 图3 (a) 不同浓度五味子甲素标准品溶液与c-kit结合的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号变化; (b) 不同浓度五味子甲素标准品溶液与c-kit结合的线性拟合结果。

[0027] 图4 (a) 不同浓度五味子甲素标准品溶液与SCF结合的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号变化; (b) 不同浓度五味子甲素标准品溶液与SCF结合的线性拟合结果。

[0028] 图5 (a) 不同浓度SCF和五味子甲素标准品混合溶液与c-kit结合的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号变化; (b) 不同浓度SCF和五味子甲素标准品混合溶液与c-kit结合的线性拟合结果。

[0029] 图6 (a) 不同浓度五味子甲素标准品和SCF混合溶液与c-kit结合的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号变化; (b) 不同浓度五味子甲素标准品和SCF混合溶液与c-kit结合的线性拟合结果。

[0030] 图7各组大鼠睾丸组织SCF和c-kit蛋白表达情况。

## 具体实施方式

[0031] 实施例1一种c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器的制备

[0032] (1) 采用CHI-660E电化学工作站工作站,测定AlGaAs/GaAs HEMT器件各通道的 $I_{DS}-V_{DS}$ 曲线,判断比较各通道性能。

[0033] (2) 将干净的AlGaAs/GaAs HEMT器件置于3-巯基丙酸(3-MPA)水溶液,于室温下浸泡,在AlGaAs/GaAs HEMT器件表面生成Au-S键,形成自组装单层;

[0034] (3) 配制20mM碳酰二亚胺盐酸盐和50mM N-羟基丁二酰亚胺体积比为 1:1的混合水溶液,作为羧基活化液待用,用去离子水洗去AlGaAs/GaAs HEMT 器件表面的3-MPA,加入羧基活化液生成稳定的胺类活化产物用于活化羧基;

[0035] (4) 用10mM磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗AlGaAs/GaAs HEMT器件,加入浓度为100mg/mL的络氨酸激酶c-kit,于4℃下反应2小时,即得 c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器。

[0036] (5) 采用CHI-660E电化学工作站其 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号,结果如图1所示,由图可知,c-kit修饰之后,电流发生明显改变,表明c-kit成功修饰于AlGaAs/GaAs HEMT器件之上,c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器成功构建。

[0037] 实施例2一种SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器的制备

[0038] (1) 采用CHI-660E电化学工作站,测定AlGaAs/GaAs HEMT器件各通道的 $I_{DS}-V_{DS}$ 曲线,判断比较各通道性能。

[0039] (2) 将干净的AlGaAs/GaAs HEMT器件置于3-巯基丙酸(3-MPA)水溶液,于室温下浸泡,在AlGaAs/GaAs HEMT器件表面生成Au-S键,形成自组装单层;

[0040] (3) 配制20mM碳酰二亚胺盐酸盐和50mM N-羟基丁二酰亚胺体积比为 1:1的混合水溶液,作为羧基活化液待用,用去离子水洗去AlGaAs/GaAs HEMT 器件表面的3-MPA,加入羧基活化液生成稳定的胺类活化产物用于活化羧基;

[0041] (4) 用10mM磷酸盐缓冲溶液(PBS)清洗AlGaAs/GaAs HEMT器件,加入浓度为100mg/mL的重组人干细胞因子SCF,于4℃下反应2小时,即得 SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器;

[0042] (5) 采用CHI-660E电化学工作站其 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号,结果表明SCF修饰之后,电流发生明显改变,表明SCF成功修饰于AlGaAs/GaAs HEMT器件之上, SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器成功构建。

[0043] 实施例3AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测SCF与c-kit相互作用的应用

[0044] (1) 用0.1M的PBS缓冲液溶解SCF至0.1mg/L,按十倍梯度稀释至0.1pg/L;按照实施例1方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,以此为反应器件,按浓度由低到高的依次向c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT器件上加入SCF蛋白溶液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度( $I_{DS}$ ),不同浓度下的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号如图2(a)所示;由图可知,当浓度范围为0.1pg/L-0.1mg/L时, $I_{DS}$ 信号的绝对值不断下降;

[0045] (2) 以SCF蛋白溶液浓度的对数( $\lg[A_g]$ )为横坐标,以电流变化相对值  $(I-I_0)/I_0$  为纵坐标,进行线性拟合,结果表明当浓度范围为0.1pg/L-1.0ng/L时,线性关系较好;取0.1pg/L-1.0ng/L五个浓度点进行线性拟合,结果如图2(b)所示,由图可知,线性关系良好,方程为 $y=-0.03460x-0.5036$  ( $R^2=0.9973$ );

[0046] (3) 根据(2)的浓度范围,以SCF蛋白溶液的浓度 ( $[A_g]$ ) 为横坐标,以浓度 ( $[A_g]$ ) / 电流变化  $(I-I_0, \Delta I)$  为纵坐标,进行线性拟合,得到线性方程为  $y=2170.5x+8E-09$ , ( $R^2=0.9998$ );根据公式

$$[0047] \quad [A_b]+[A_g] \leftrightarrow [A_b-A_g] \quad (1)$$

$$[0048] \quad K=K_A=\frac{1-[A_b-A_g]}{K_D [A_b][A_g]} \quad (2)$$

$$[0049] \quad \frac{[A_g]}{\Delta I} = \frac{[A_g]}{\Delta I_{\max}} + \frac{K_D}{\Delta I_{\max}} \quad (3)$$

[0050] 其中 $[A_b]$ 为c-kit蛋白浓度, $[A_g]$ 为SCF蛋白溶液的浓度 $[C]$ , $K$ 及 $K_A$ 为结合常数, $K_D$ 为解离常数, $\Delta I$ 为电流变化值, $\Delta I_{\max}$ 为电流最大变化值。

[0051] 计算SCF与c-kit相互作用的解离常数 $K_D$ ,得 $K_D=3.686 \times 10^{-12}M$ 。

[0052] 实施例4AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素与c-kit相互作用的应用

[0053] (1) 分别精密称取黄精繁育胶囊有效成分五味子甲素标准品置于容量瓶中, 分别加入10mM PBS溶液配置成1mM五味子甲素标准品溶液作为母液, 按十倍梯度稀释母液至0.1pM, 制备11个浓度梯度五味子甲素标准品梯度浓度样品溶液;

[0054] (2) 按照实施例1方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器, 以此为反应器件, 按浓度由低到高的依次向c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT器件上加入五味子甲素标准品溶液, 采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度( $I_{DS}$ ), 不同浓度下的 $I_{DS}$ - $V_{DS}$ 信号如图3(a)所示; 由图可知, 当浓度范围为0.1pM-1.0 $\mu$ M时,  $I_{DS}$ 信号的绝对值不断下降; 当浓度超过1.0 $\mu$ M时,  $I_{DS}$ 信号变化无规律;

[0055] (3) 以五味子甲素标准品溶液浓度的对数( $\lg[A_g]$ )为横坐标, 以电流变化相对值 $(I-I_0)/I_0$ 为纵坐标, 进行线性拟合, 结果表明当浓度范围为1.0pM-10nM时, 线性关系较好; 取1.0pM-10nM五个浓度点进行线性拟合, 结果如图3(b)所示, 由图可知, 线性关系良好, 方程为 $y = -0.09810x - 1.5551$  ( $R^2 = 0.9981$ );

[0056] (4) 根据(3)的浓度范围, 以五味子甲素标准品溶液的浓度( $[A_g]$ )为横坐标, 以浓度( $[A_g]$ )/电流变化 $(I-I_0, \Delta I)$ 为纵坐标, 进行线性拟合, 得到线性方程为 $y = 877.06x + 5E-08$ , ( $R^2 = 0.9997$ ); 根据公式①、②和③计算五味子甲素与c-kit相互作用的解离常数 $K_D$ , 得 $K_D = 5.701 \times 10^{-11}M$ 。

[0057] 实施例5AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素与SCF相互作用的应用

[0058] (1) 分别精密称取黄精繁育胶囊有效成分五味子甲素标准品置于容量瓶中, 分别加入10mM PBS溶液配置成1mM五味子甲素标准品溶液作为母液, 按十倍梯度稀释母液至0.1pM, 制备11个浓度梯度五味子甲素标准品梯度浓度样品溶液;

[0059] (2) 按照实施例2方法制备SCF-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器, 以此为反应器件, 按浓度由低到高的依次向SCF-AlGaAs/GaAs HEMT器件上加入五味子甲素标准品溶液, 采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度( $I_{DS}$ ), 不同浓度下的 $I_{DS}$ - $V_{DS}$ 信号如图4(a)所示; 由图可知, 当浓度变化时,  $I_{DS}$ 信号基本无变化; 以五味子甲素标准品溶液浓度的对数( $\lg[A_g]$ )为横坐标, 以电流变化相对值 $(I-I_0)/I_0$ 为纵坐标, 进行线性拟合, 基本为与X轴平行的直线(图4(b)), 结果表明五味子甲素与SCF无相互作用。

[0060] 实施例6AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素对SCF与c-kit相互作用影响的应用

[0061] (1) 取7份浓度为10pM的五味子甲素标准溶液, 每份60 $\mu$ L, 分别向其中加入等体积的浓度范围为0.1pg/L-0.1 $\mu$ g/L的SCF蛋白溶液, 混匀备用;

[0062] (2) 按照实施例1方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器, 以此为反应器件, 按浓度由低到高的依次向c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT器件上加入五味子甲素标准品溶液和SCF蛋白溶液的混合液, 采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度( $I_{DS}$ ), 不同浓度下的 $I_{DS}$ - $V_{DS}$ 信号如图5(a)所示; 由图可知, 当浓度范围为0.1pg/L-0.1 $\mu$ g/L时,  $I_{DS}$ 信号的绝对值不断下降;

[0063] (3) 以五味子甲素标准品溶液浓度的对数( $\lg[A_g]$ )为横坐标, 以电流变化相对值 $(I-I_0)/I_0$ 为纵坐标, 进行线性拟合, 结果表明当浓度范围为1.0pg/L-10ng/L时, 线性关系较好; 取1.0pg/L-10ng/L五个浓度点进行线性拟合, 结果如图5(b)所示, 由图可知, 线性关系良好, 方程为 $y = -0.04880x - 0.6145$  ( $R^2 = 0.9994$ );

[0064] (4) 根据(3)的浓度范围,以五味子甲素标准品溶液的浓度( $[A_g]$ )为横坐标,以浓度( $[A_g]$ )/电流变化( $I-I_0$ ,  $\Delta I$ )为纵坐标,进行线性拟合,得到线性方程为  $y=585.04x+6E-08$ , ( $R^2=0.9992$ );根据公式①、②和③计算五味子甲素与c-kit相互作用的解离常数 $K_D$ ,得  $K_D=1.026 \times 10^{-10}M$ 。

[0065] 实施例7 AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器在检测五味子甲素对SCF与c-kit相互作用影响的应用

[0066] (1) 取7份浓度为 $10\mu g/L$ 的SCF蛋白溶液,每份 $60\mu L$ ,分别向其中加入等体积的浓度范围为 $10pM-10\mu M$ 的五味子甲素标准品溶液,混匀备用;

[0067] (2) 按照实施例1方法制备c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT生物传感器,以此为反应器件,按浓度由低到高的依次向c-kit-AlGaAs/GaAs HEMT器件上加入SCF蛋白溶液和五味子甲素标准品溶液的混合液,采用电化学装置记录源极-漏极间的电流强度( $I_{DS}$ ),不同浓度下的 $I_{DS}-V_{DS}$ 信号如图6(a)所示;由图可知,当浓度范围为 $10pM-10\mu M$ 时, $I_{DS}$ 信号的绝对值不断下降;

[0068] (3) 以五味子甲素标准品溶液浓度的对数( $Lg[A_g]$ )为横坐标,以电流变化相对值( $I-I_0$ )/ $I_0$ 为纵坐标,进行线性拟合,结果表明当浓度范围为 $10pM-0.1\mu M$ 时,线性关系较好;取 $1.0pg/L-10ng/L$ 五个浓度点进行线性拟合,结果如图6(b)所示,由图可知,线性关系良好,方程为 $y=-0.04880x-0.6145$  ( $R^2=0.9994$ );

[0069] (4) 根据(3)的浓度范围,以五味子甲素标准品溶液的浓度( $[A_g]$ )为横坐标,以浓度( $[A_g]$ )/电流变化( $I-I_0$ ,  $\Delta I$ )为纵坐标,进行线性拟合,得到线性方程为  $y=221.07x+3E-08$ , ( $R^2=0.9992$ );根据公式①、②和③计算五味子甲素与c-kit相互作用的解离常数 $K_D$ ,得  $K_D=1.357 \times 10^{-10}M$ 。

[0070] 实施例8少、弱精子症大鼠模型的构建及表征

[0071] (1) 实验动物

[0072] SPF级雄性SD大鼠70只,体重 $170-190g$ ,来源于斯贝福(北京)实验动物科学技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2011-0004。所有动物均饲养于北京中医药大学实验动物实验室常规饲养,实验室温度为 $22-24^\circ C$ ,湿度为 $52-56RH\%$ ,12h光照/12h黑暗交替,自由饮水进食。本次实验所有操作均严格按照动物伦理相关规定进行。

[0073] (2) 主要器材

[0074] 离心机:Eppendorf公司,型号:Centrifuge 5810R;电子天平:A&D公司,型号:GR-200;伟力精子质量检测系统:北京伟力公司,型号:WL-9000; $37^\circ C$ 恒温孵化箱:北京科伟永兴仪器有限公司,型号:HH-S6A型;灌胃针,50mL离心管,1.5mLEP管,5mL冻存管,1mL、2mL、5mL一次性注射器,眼科剪、镊、手术刀片等。

[0075] (3) 主要试剂与实验用药

[0076] 雷公藤多苷(glucoside tripterygium wilfordine,GTW):上海复旦复华药业有限公司,批号:160902;羧甲基纤维素钠(CMC):源叶生物,批号:L13M8G35918;M199培养基:HYCLONE公司;水合氯醛:北京化学试剂公司。五味子甲素(Schisandrin A):BioRuler公司,批号PS000928;左卡尼汀:大连美罗中药厂有限公司,批号:01161202;上述药品临用前混悬于 $0.5\%$ 的羧甲基纤维素(CMC)中备用。

[0077] (4) 药物用量计算

[0078] 大鼠灌胃药量计算:

[0079] 以人口服五味子甲素的剂量为基准,根据大鼠与人体表面积之比进行剂量换算:人体表面积计算公式:体表面积( $m^2$ )= $0.0061 \times$ 身高(cm)+ $0.0128 \times$ 体重(kg)- $0.1529$ ;大鼠体表面积计算公式:体表面积( $m^2$ )= $9.1 \times (W^2/3/10000)$ ,其中W为大鼠体重;大鼠剂量(mg/kg)=人剂量 $\times$ 人体表面积/大鼠体表面积

[0080] 根据成人用量分别设置大鼠灌胃高剂量、中剂量、低剂量,分别为成人用量的20倍、10倍、5倍。五味子甲素高剂量:22.5mg/(kg·d);五味子甲素中剂量:11.25mg/(kg·d);五味子甲素低剂量:5.625mg/(kg·d);左卡尼汀:2.1mL/(kg·d)

[0081] 造模:雷公藤多苷20mg/(kg·d),连续灌胃35d(5w),建立少、弱精子症大鼠模型。

[0082] (5) 实验方法

[0083] 将造模大鼠用GTW 20mg/(kg·d)进行灌胃,每天一次,连续35天(5周),建立少、弱精子症大鼠模型。

[0084] SD大鼠70只,随机分为7组,即正常组1组,模型组1组,五味子甲素高、中、低剂量各1组,西药阳性对照组(左卡尼汀组)1组;其中正常组与模型组各15只,五味子高、中、低剂量组、左卡尼汀组、黄精赞育组各10只。适应性饲养5天。

[0085] 正常组(NS):每日予以2mL 0.5%CMC灌胃35天。第35天随机取5只处死,通过精液参数检测作为GTW组对照以确定造模是否成功。造模成功后,剩余大鼠继续2mL 0.5%CMC灌胃35天。

[0086] 模型组(GTW):予以GTW 20mg/(kg·d)灌胃35天,第35天随机取5只处死,通过精液参数检测对比NS组以确定造模是否成功。造模成功后,剩余大鼠继续给予2mL 0.5%CMC灌胃35天。

[0087] 五味子甲素组(Schizandrin A):分为高、中、低三个剂量组。予以GTW 20mg/(kg·d)灌胃35天,自第36天起分别予以五味子甲素22.5mg/(kg·d)、11.25mg/(kg·d)、5.625mg/(kg·d)进行灌胃,连续灌胃35天。

[0088] 左卡尼汀组(Levocarnitine):予以GTW 20mg/(kg·d)灌胃35天,自第36天起予以左卡尼汀2.1mL/kg·d进行灌胃,连续灌胃35天。

[0089] 灌胃期间,每周称取大鼠体重一次,并根据最新体重对灌胃剂量予以调整。每天观察并记录各组实验动物的进食情况、精神状态、活动表现、毛色、皮肤、大便等情况。

[0090] (6) 实验大鼠取材

[0091] 所有大鼠最后一次给药24h后,水合氯醛麻醉后腹主动脉取血,放血处死实验动物,并迅速摘取睾丸、附睾,称取睾丸重量,备用。

[0092] 每组随机选取7只大鼠送检,使用扩散法收集附睾尾精子。取附睾尾部放入3mL 37℃生理盐水中,剪碎并静置1min,制成精子混悬液。取出50 $\mu$ L精子混悬液置于1mL M199培养基中,37℃恒温水浴5min,从中取出13 $\mu$ L精子混悬液涂于预温的血细胞计数板进行精子质量分析。

[0093] (7) 造模结果评价

[0094] 造模期:NS组:大鼠体重逐渐增加。毛色光泽,活动敏捷,精神状态佳。食量日渐增加,体温正常。排便正常,大便呈实粒状。随实验进行打斗次数增多,较为活跃。死亡1只,于灌胃第2日死亡,尸体遭到同伴啃食。GTW造模各组:大鼠体重逐渐增加,体重增长略快于NS

组。造模期间出现毛色光泽度降低,偶有掉毛,喜抱团蜷缩,活动较NS组迟缓,精神不佳。食量日渐增加,体温触之较低,少部分大鼠身体发凉,尾巴冰凉。造模初期出现便溏情况,便质软烂如泥,呈浅棕色;造模中后期大便逐渐恢复正常,但便质普遍偏软,部分大鼠粪便松软,按之则烂。死亡2只,分别于灌胃第2、3日死亡。

[0095] 给药期:NS组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色光泽,活动敏捷,精神状态佳,喜打斗。食量趋于稳定,体温正常。排便正常,大便呈实粒状。GTW组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色逐渐恢复光泽,精神状况略有改善;活动仍较缓,不及其他组活跃,打斗现象较其他组少。食量趋于稳定,体温正常,尾巴偏凉,实验后期趋于正常。大便正常,便质偏软,按之即陷。左卡尼汀组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色逐渐恢复光泽,精神状况与活动状态改善,打斗增多。食量趋于稳定,体温正常,尾巴偏凉,实验后期趋于正常。大便正常,粪便呈实粒状,按之较硬。五味子甲素高剂量组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色逐渐恢复光泽,精神状况与活动状态改善,打斗增多。食量趋于稳定,体温正常。大便正常,粪便呈实粒状,按之较硬。五味子甲素中剂量组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色逐渐恢复光泽,精神状况与活动状态改善,打斗增多。食量趋于稳定,体温正常。大便正常,粪便呈实粒状,按之可陷。五味子甲素低剂量组:大鼠体重逐渐增加,实验后期体重增长幅度放缓。毛色逐渐恢复光泽,精神状况略有改善,活动状态不及其他剂量组,打斗较少。食量趋于稳定,体温正常。大便正常,粪便呈实粒状,按之可陷。

[0096] 采用WL-9000型精子质量检测系统(CASA),设置测试温度为37℃,将经处理的精子混悬液涂于计数板上,选取5个视野,并于2min内完成测试。主要测试指标:精子密度( $\times 10^6/\text{mL}$ )、精子活力(%)、精子活动率(%)、a级精子率(%)、b级精子率(%)。结果表明(表1):造模后,GTW组大鼠精子密度、b级精子率显著减少,其中精子密度与NS组相比有明显差异( $P < 0.05$ ),GTW组大鼠精子活动率均明显下降,与NS组比较有明显差异( $P < 0.05$ ),表示造模成功。

[0097] 表1各组精子密度、a级精子率、b级精子率检测值( $\bar{x} \pm S$ )

组别	n	精子密度 ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	a级精子率 (%)	b级精子率 (%)	精子活力(%)	精子活动率 (%)
[0098] NS组	7	113.433 $\pm$ 35.454	5.421 $\pm$ 2.383	13.274 $\pm$ 5.392	18.697 $\pm$ 7.354	52.916 $\pm$ 10.635
GTW组	7	31.239 $\pm$ 11.842*	4.959 $\pm$ 4.189	8.520 $\pm$ 6.778	13.477 $\pm$ 10.603	33.350 $\pm$ 18.976*

[0099] 注:与NS组比较:\* $P < 0.05$ ;与GTW组比较:# $P < 0.05$ 。

[0100] 实施例9蛋白免疫反应方法在黄精赞育胶囊有效成分治疗少、弱精子症体外信号通路检测的应用

[0101] (1) 大鼠睾丸取材:所有大鼠最后一次给药24小时后,水合氯醛麻醉腹主动脉取血,放血处死实验动物,并迅速摘取睾丸、附睾备用;取每只大鼠的同侧睾丸于Davidson's固定液中固定24h,组织液体的体积比为1:20,每12h换一次液;固定24h后,移入中性福尔马林固定液中固定24-48h。组织修块后用流水冲洗12h;顺梯度酒精浓度由低到高进行脱水,脱水结束后经二甲苯透明,予以石蜡包埋,制得睾丸石蜡切片备用;

[0102] (2) 大鼠睾丸蛋白提取:切取并称量100mg睾丸组织,剪碎,加入0.01mol/L PBS缓冲液,于4℃下2500rpm离心1min,弃去上清液;加入含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液0.5mL于组织中,匀浆至组织块消失;将组织浆液置于摇床上,振荡裂解30min,再于4℃下12000rpm离心15min,吸取上清备用;以0.5mg/mL 的牛血清白蛋白(BSA),为标准液,采用酶标仪,测算样本蛋白浓度;

[0103] (3) 根据蛋白浓度测定结果,将样本浓度调整至10ug/L,加入5xSDS缓冲液混匀,于加热器中95℃水浴加热10min,使蛋白充分变性;使用12%SDS-PAGE 电泳分离蛋白,制胶,上样,60V电压电泳30min,当样本进入分离胶时,120V 电压电泳1.5h,当溴酚蓝跑至胶底时停止电泳,冲洗并切割胶片;300mA恒流电转PVDF膜1.5h后,浸入10倍稀释后的丽春红染液染膜;封闭PVDF膜备用;

[0104] (4) 采用山羊血清工作液将SCF、c-kit抗体均予以1:100体积比例稀释,取出封闭后的PVDF膜,PBST洗涤3次,每次10min,洗涤完毕将膜放入杂交袋中。使用山羊血清工作液PBST将SCF、c-kit一抗予以1:100体积比例稀释,放入杂交袋于4℃过夜。次日取出PVDF膜,PBST振摇洗涤3次,每次10min.洗涤完毕,将PVDF膜放入新杂交袋中,倒入配制好的二抗,振摇孵育1h,将膜取出,PBST洗涤3次,每次10min.将PVDF膜放入发光仪,滴加ECL显色液孵育30s,使用数码凝胶图像分析系统予以拍照,计算SCF和c-kit的表达情况;

[0105] (5) 睾丸组织中SCF和c-kit的表达情况如表2和图7所示,结果表明少弱精子症模型组相比正常组,SCF表达显著减少;模型大鼠给药后,左卡尼汀组、五味子甲素高、中剂量组SCF蛋白含量显著上升( $P<0.05$ ),其中五味子甲素高剂量组最接近正常组,而五味子甲素低剂量组仅在部分生精小管内发现阳性颗粒, SCF含量虽有上升,但差异不明显。少相比正常组,弱精子症模型组c-kit蛋白表达升高,给药后各组c-kit蛋白含量均有所下降,其中五味子甲素高、中剂量组下降最为明显。

[0106] 表2各组别睾丸组织中SCF和c-kit蛋白表达结果

	组别	SCF	c-kit
	NS 组	39.88±6.49	85.13±29.39
	GTW 组	1.89±1.15*	141.46±22.01*
[0107]	左卡尼汀组	24.00±6.26 <sup>#</sup>	123.70±19.81
	五味子甲素高剂量组	32.83±4.33 <sup>#</sup>	117.49±29.02
	五味子甲素中剂量组	21.80±11.02 <sup>#</sup>	115.50±25.37
	五味子甲素低剂量组	4.36±2.99	121.66±31.53

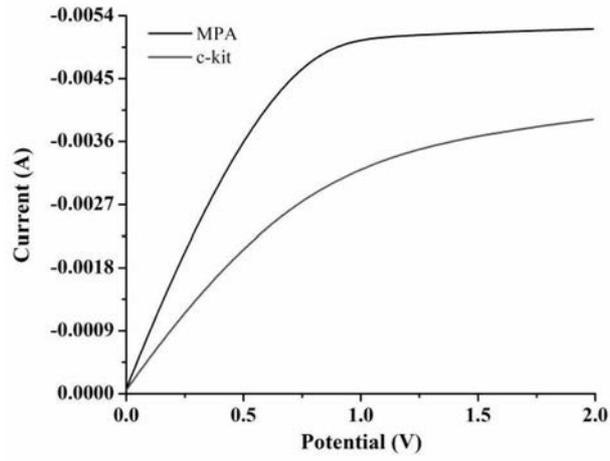


图1

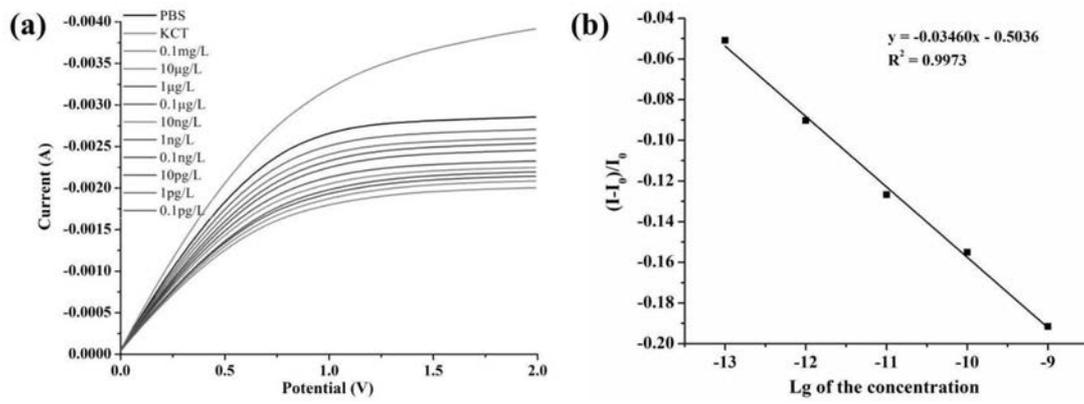


图2

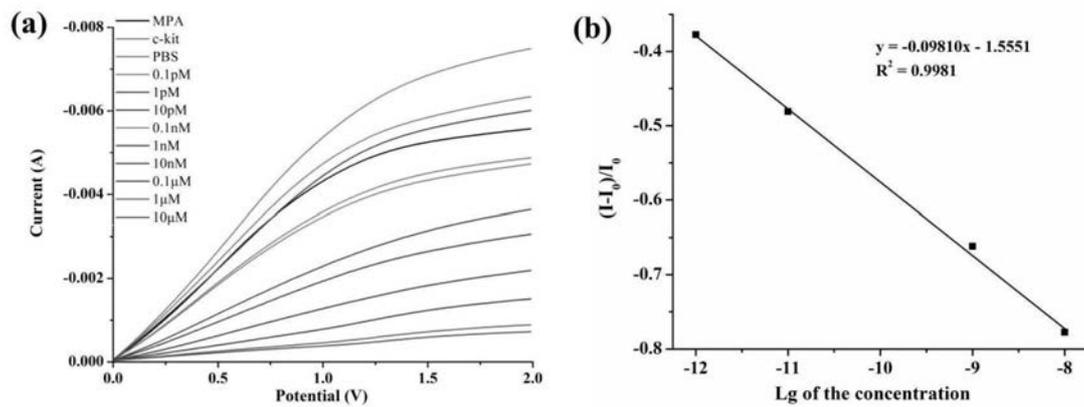


图3

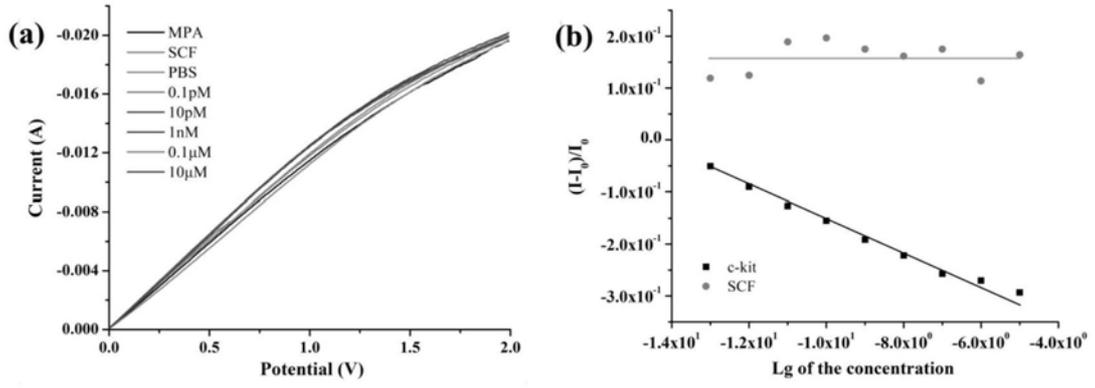


图4

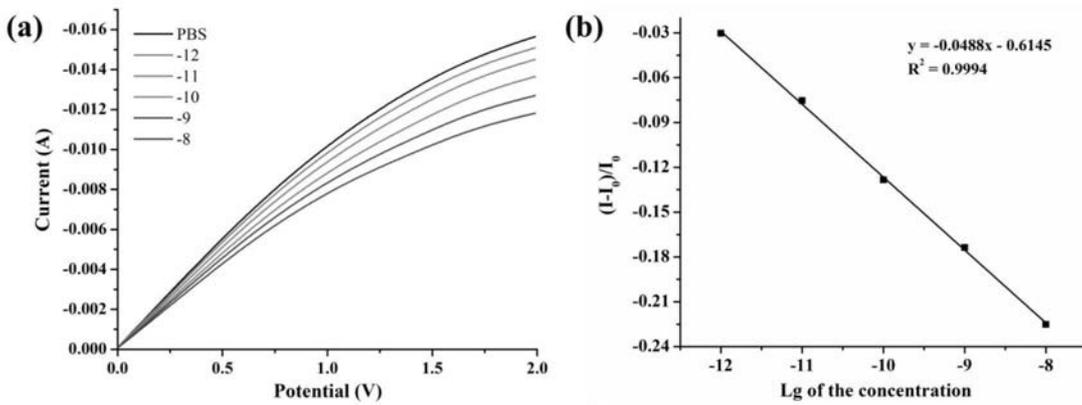


图5

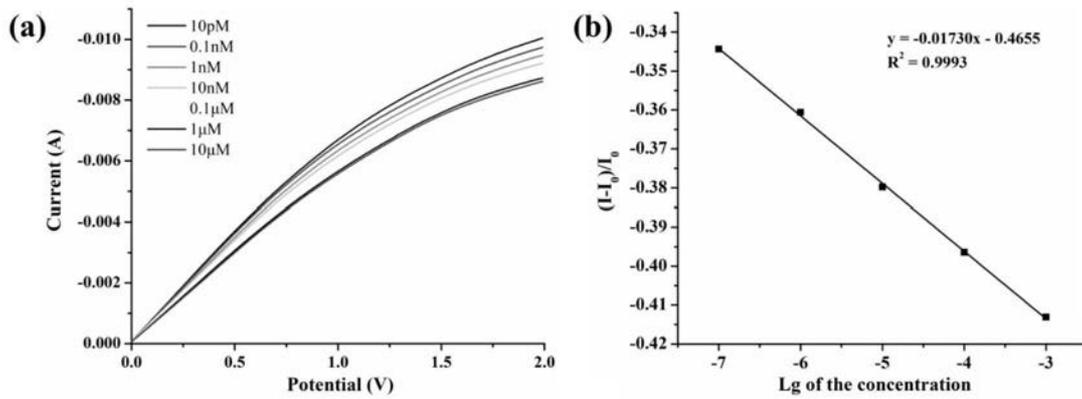


图6

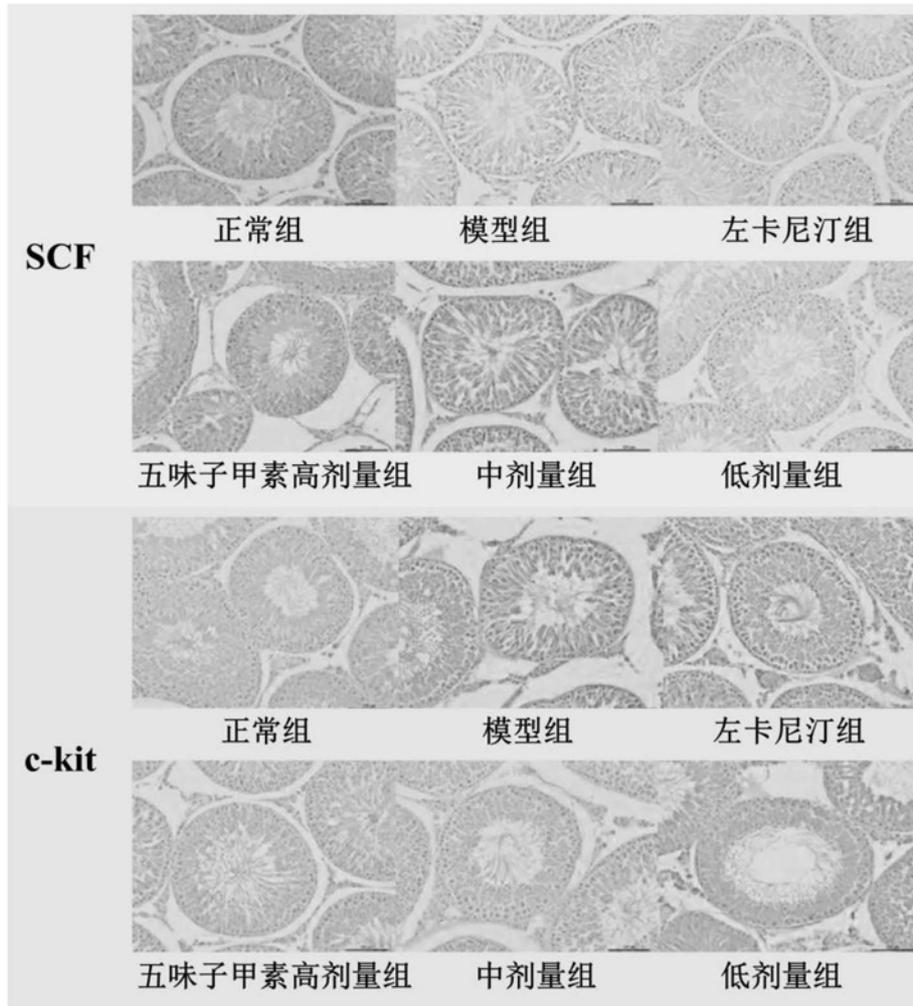


图7