



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109884324 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201910070323.0

(22)申请日 2019.01.25

(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 王军 张振忠 汝少国 王蔚

(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 33/74(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

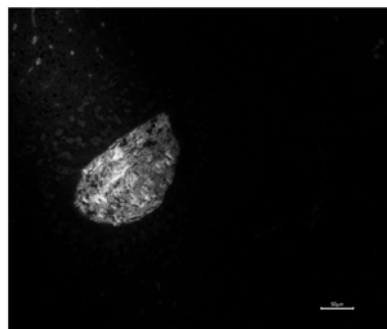
权利要求书1页 说明书5页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用

(57)摘要

检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用。通过原核表达的方法制备褐牙鲈卵壳前体蛋白,免疫小鼠开发褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体,并将FITC标记到纯化的多克隆抗体上;由标记了FITC的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体构建检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒。本发明不仅可用于检测褐牙鲈鱼体中卵壳前体蛋白的产生,还可以对卵壳前体蛋白在肝脏组织中的部位进行定位。与之前的免疫组化相比,本发明步骤较少,节约时间,检测本底值低,为海洋环境雌激素的筛选、检测和生态环境风险评估提供重要工具。



1. 一种检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于该试剂盒装有FITC标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体1支。

2. 根据权利要求1所述的检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒,其特征在于所述的FITC标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体是用以下方法制备:

(1) 通过肌肉注射17 β -雌二醇诱导褐牙鲈肝脏大量转录Chg H mRNA,用Trizol提取肝脏总RNA,经反转录获得cDNA,以反转后的cDNA为模版,利用引物F: CACCCAAGTTTTCAAGTCTCAGCAGTC, R: CCGCTTACTGAGCAGGGTCAATGAAT进行PCR扩增,回收目的片段;用T4连接酶将目的片段与pClone007载体连接后,将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞中,并进行测序,将测序正确的进行扩大培养,抽提质粒,以上述引物进行PCR扩增,切胶回收目的片段;

将回收的目的片段与pDE1表达载体连接后,将连接产物转化至表达宿主菌BL21 (DE3);并将正确表达的宿主菌扩大培养,即加入终浓度为0.1 mM的IPTG,置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床里震荡培养10小时,将培养好的菌液5000 rpm 离心20 min,收集沉淀,经裂解液处理后,再次离心收集包涵体,向包涵体中加入30 mL溶解液(100 mM Tris,500 mM NaCl,10 mM咪唑,8 M尿素,pH8.0),4 $^{\circ}$ C搅拌过夜;将溶解后的包涵体10000 rpm 离心30 min,收集上清并过0.45 μ m滤膜,采用镍离子螯合磁珠纯化,即获得褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品;

(2) 利用得到的褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品免疫小鼠:将70 μ g的卵壳前体蛋白纯品和等体积的弗式完全佐剂乳化后注射入小鼠腹腔,两周后用同样剂量的卵壳前体蛋白纯品与弗氏不完全佐剂充分乳化后对Balb/c小鼠进行加强免疫,一周后尾静脉注射卵壳前体蛋白纯品进行加强免疫,三天后取小鼠的血清,利用Protein G亲和层析柱从腹水上清中纯化获得免疫球蛋白IgG;纯化的抗体经PBS缓冲液透析24 h,即获得褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体;

(3) 将浓度为1 mg/mL纯化的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体置于交联反应液(7.56g NaHCO₃,1.06g Na₂CO₃,7.36g NaCl,1 L ddH₂O)中4 $^{\circ}$ C透析过夜;按抗体:FITC=6:1的比例,称取FITC,缓慢加入抗体溶液中以将FITC标记至抗体;边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处4 $^{\circ}$ C反应8 h;用半饱和的硫酸铵将标记后的抗体沉淀分离,以除去未结合的荧光素,将交联物在PBS中透析至透析液清亮,即获得FITC标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体。

3. 权利要求1所述的检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒,在海洋环境雌激素类物质检测中的应用。

检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用

技术领域

[0001] 本发明属于环境检测领域,具体涉及一种检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用。

背景技术

[0002] 环境雌激素作为一类外源性化合物进入机体后,具有干扰体内正常分泌物质的合成、释放、运转、代谢、结合等过程,激活或抑制内分泌系统功能,从而破坏其维持机体稳定性和调控作用。近年来,环境中雌激素污染对自然环境的生态平衡及人类的健康构成了潜在的威胁,环境雌激素物质进入人体后,女性多出现子宫肌瘤、卵巢癌等疾病,男性多出现睾丸癌、精子的数量与质量下降等症状。低于1 ng/L的雌炔醇能导致雄性鳊鱼产生雌鱼特有的卵黄原蛋白,而4 ng/L的雌炔醇可导致幼鱼的性畸形,其第二性征发生改变。海洋环境雌激素可导致鱼类种群生存力和渔业资源下降。海洋环境雌激素污染日益严重,其中我国近岸海水中雌二醇、雌炔醇、双酚A等常见雌激素的浓度达到45.7 ng/L、3.99 ng/L、3920 ng/L。因此,为解决我国近海海域环境雌激素活性的检测,亟需建立更灵敏、准确、简便的检测技术。

[0003] 卵壳前体蛋白是近年来新发现的一种环境雌激素生物标志物,是一种雌性特异性蛋白,通常在雄鱼和幼鱼体内并不存在,但是在环境雌激素的诱导下能合成和分泌卵壳前体蛋白。通过检测雄鱼或幼鱼体内的卵壳前体蛋白含量可以评价水体环境中的雌激素活性。与目前常用的环境雌激素生物标志物卵黄原蛋白相比,卵壳前体蛋白能更加敏感快速地对环境雌激素做出响应。1 ng/L E₂就能显著上调雄性海洋青鳉(*Oryzias javanicus*)的肝脏卵壳前体蛋白基因表达水平,并且其相对表达量要明显高于卵黄原蛋白的基因表达水平。因此,卵壳前体蛋白是环境雌激素筛选的更加敏感的生物标志物,然而目前国内外均未建立卵壳前体蛋白的检测试剂盒,主要原因在于传统的分离纯化方法难以从鱼体获得卵壳前体蛋白,无法为免疫检测技术的开发提供高纯度的抗原,导致至今尚未建立卵壳前体蛋白的检测方法,并且缺乏能对卵壳前体蛋白产生部位定位定量检测的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种检测褐牙鲈卵壳前体蛋白免疫荧光试剂盒及其制备方法,以满足现有技术的上述要求。

[0005] 检测褐牙鲈卵壳前体蛋白免疫荧光试剂盒,其特征在于该试剂盒装有荧光素(FITC)标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白1支。

[0006] 上述检测褐牙鲈卵壳前体蛋白免疫荧光试剂盒中,所述的FITC标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体是以如下方法制备:

- 1) 制备褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品;
- 2) 利用步骤1)得到的褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品制备褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体;

3) 利用步骤2)得到的卵壳前体蛋白多克隆抗体制备FITC标记的卵壳前体蛋白多克隆抗体;

具体如下:

(1) 通过肌肉注射17 β -雌二醇诱导褐牙鲆肝脏大量转录Chg H mRNA,用Trizol提取肝脏总RNA,经反转录获得cDNA,以反转后的cDNA为模版,利用引物F:CACCCAAGTTTTCAAGTCTCAGCAGTC,R:CCGCTTACTGAGCAGGGTCAATGAAT进行PCR扩增,回收目的片段;用T4连接酶将目的片段与pClone007载体连接后,将连接产物转化至DH5 α 感受态细胞中,并进行测序,将测序正确的进行扩大培养,抽提质粒,以上述引物进行PCR扩增,切胶回收目的片段;

将回收的目的片段与pDE1表达载体连接后,将连接产物转化至表达宿主菌BL21(DE3);并将正确表达的宿主菌扩大培养,即加入终浓度为0.1 mM的IPTG,置于37 $^{\circ}$ C恒温摇床里震荡培养10小时,将培养好的菌液5000 rpm离心20 min,收集沉淀,经裂解液处理后,再次离心收集包涵体,向包涵体中加入30 mL溶解液(100 mM Tris,500 mM NaCl,10 mM咪唑,8 M尿素,pH8.0),4 $^{\circ}$ C搅拌过夜;将溶解后的包涵体10000 rpm离心30 min,收集上清并过0.45 μ m滤膜,采用镍离子螯合磁珠纯化,即获得褐牙鲆卵壳前体蛋白纯品;

(2) 利用得到的褐牙鲆卵壳前体蛋白纯品免疫小鼠:将70 μ g的卵壳前体蛋白纯品和等体积的弗式完全佐剂乳化后注射入小鼠腹腔,两周后用同样剂量的卵壳前体蛋白纯品与弗氏不完全佐剂充分乳化后对Balb/c小鼠进行加强免疫,一周后尾静脉注射卵壳前体蛋白纯品进行加强免疫,三天后取小鼠的血清,利用Protein G亲和层析柱从腹水上清中纯化获得免疫球蛋白IgG;纯化的抗体经PBS缓冲液透析24 h,即获得褐牙鲆卵壳前体蛋白多克隆抗体;

(3) 将浓度为1 mg/mL纯化的褐牙鲆卵壳前体蛋白多克隆抗体置于交联反应液(7.56g NaHCO₃,1.06g Na₂CO₃,7.36g NaCl,1 L ddH₂O)中4 $^{\circ}$ C透析过夜;按抗体:FITC=6:1的比例,称取FITC,缓慢加入抗体溶液中以将FITC标记至抗体;边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处4 $^{\circ}$ C反应8 h;用半饱和的硫酸铵将标记后的抗体沉淀分离,以除去未结合的荧光素,将交联物在PBS中透析至透析液清亮,即获得FITC标记的褐牙鲆卵壳前体蛋白多克隆抗体。

[0007] 上述检测褐牙鲆卵壳前体蛋白免疫荧光试剂盒在海洋环境雌激素污染调查中的应用。

[0008] 本发明的优点

本发明采用的免疫荧光组织化学检测技术是以抗体为基础,具有灵敏快捷,特异性高等特点,适用于对卵壳前体蛋白的定位定量检测的技术。因此,本发明采用原核表达技术制备重组卵壳前体蛋白,制备高灵敏度的抗体,将FITC标记到纯化的抗体上,建立卵壳前体蛋白的免疫检测技术,开发能够检测海洋雌激素活性的试剂盒。

[0009] 另一方面,褐牙鲆隶属于鲽形目,牙鲆科,牙鲆属,是肉食性底栖鱼类,其发育过程中有变态过程。褐牙鲆主要分布于中国的黄渤海、东海以及朝鲜、日本沿岸水域。目前在中国、韩国、日本沿海均有养殖,是重要的海水增养殖鱼种。因此在海洋环境污染日趋严重的情况下,有必要把鲆鲽类作为海洋污染物对海洋鱼类污染研究的实验模型,于是本发明利用褐牙鲆的卵壳前体蛋白作为生物标志物对环境雌激素进行检测。

[0010] 本发明为进一步提高对微量水平雌激素活性的检测敏感度和特异性,以一种稳定的卵壳前体蛋白为抗原,以及其多克隆抗体,首次建立了褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光检测方法,并且利用原核表达技术实现卵壳前体蛋白的大量制备,以期海洋环境雌激素的灵敏检测提供业务化工具。此外,本发明的免疫荧光技术中涉及的抗体标记技术相比之前的抗体技术,无需复杂的设备,更适合低剂量的抗体标记;本发明的免疫荧光组织化学技术相比常规的免疫组化技术步骤更为简便,节省时间,具有更低的本底值。同时本发明的免疫荧光组织化学技术相比酶联免疫吸附技术能更直观的观察卵壳前体蛋白在肝脏组织中的分布。

附图说明

[0011] 图1为本发明的免疫荧光试剂盒对雄性褐牙鲈肝脏组织的检测结果。

[0012] 图2为本发明的免疫荧光试剂盒对经10 ng/L乙炔雌二醇暴露后雄性褐牙鲈肝脏组织检测结果。

[0013] 图3为本发明的免疫荧光试剂盒对经50 ng/L乙炔雌二醇暴露后雄性褐牙鲈肝脏组织检测结果。

[0014] 具体实施方式:

一种检测褐牙鲈卵壳前体蛋白免疫荧光试剂盒,其特征在于该试剂盒装有FITC标记的鼠抗褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体1支。

[0015] 制备检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光检测技术包括以下步骤:

- (一) 制备褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品;
- (二) 制备褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体;
- (三) 制备FITC标记的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体;

其中,所述(一)制备褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品方法如下:

- (1) 制备褐牙鲈卵壳前体蛋白纯品

① 卵壳前体蛋白原核表达载体的构建

通过肌肉注射E2诱导褐牙鲈肝脏大量转录Chg H mRNA,用Trizol提取肝脏总RNA,按照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa 公司)说明反转录获得cDNA。以F: CACCCAAGTTTCAAGTCTCAGCAGTC, R: CCGCTTACTGAGCAGGGTCAATGAATPCR 进行扩增,扩增条件为:98℃预变性1 min,95℃变性20 s,55℃退火20 s,72℃延伸1 min 30 s,30个循环后72℃继续延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳回收、纯化。用T4连接酶将纯化的目的片段与pClone007 载体连接后,将连接产物转化至DH5α感受态细胞中,挑选阳性克隆进行鉴定和测序验证。将测序正确的菌液进行扩大培养,用EasyPure Plasmid MiniPrep Kit 进行小量抽提质粒,以提取的质粒为模板,以上述相同引物进行PCR扩增,PCR扩增条件为:98℃预变性3 min,98℃变性20 s,55℃退火10 s,72℃延伸30 s,72℃终循环2 min,共25个循环,将PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳回收纯化。将纯化的目的片段与pDE1表达载体连接后,将连接产物转化至DH5α感受态细胞并挑选单克隆阳性菌进行扩大培养和菌液PCR,再将已经构建好的重组表达载体转化至大肠杆菌表达宿主菌BL21 (DE3),并将正确表达的宿主菌扩大培养,加入终浓度为0.1 mM的IPTG,置于37℃恒温摇床里震荡培养10小时,即获得可表达卵壳前体蛋白的表达载体。

[0016] ② 卵壳前体蛋白重组蛋白的制备

利用步骤(1)得到的CHg H重组蛋白的诱导表达条件扩大培养,将诱导好的表达大肠杆菌分装至50 mL离心管,于高速离心机中室温5000 rpm 离心20 min,收集菌体沉淀。每管中加入25 mL裂解液(100 mM NaCl,50 mM Tris,PH 8.0)重悬菌体,并加入PMSF,采用超声破碎的方法提取蛋白,超声功率为360 W,超声每个循环程序为超声2 s,间歇3 s,共360个循环,整个超声过程均在冰上进行。超声结束后,将悬液置于4℃以12000 rpm 转速离心30 min,离心所得到的沉淀即为包涵体,里面含有不溶于裂解液的蛋白。向包涵体中加入25 mL含2%Triton X-100的洗涤液(50 mM Tris,100 mM NaCl,0.5 mM EDTA,2 M 尿素),吹打均匀包涵体沉淀,冰上静置10 min后于高速离心机中4℃ 10000 rpm 离心20 min,弃上清保留沉淀。重复洗涤一次。然后再用不含Triton X-100 的洗涤液重复洗涤2次。向洗涤后的包涵体中加入30 mL溶解液(100 mM Tris,500 mM NaCl,10 mM 咪唑,8 M 尿素,PH=8.0),吹打均匀,置于磁力搅拌器上搅拌过夜,整个操作过程均在4℃下进行。溶解后的包涵体于高速离心机中4℃ 10000 rpm 离心30 min,收集上清并过0.45μm滤膜,即制备了卵壳前体蛋白。

[0017] ③ 卵壳前体蛋白重组蛋白的纯化

利用步骤②得到的含有目的蛋白的上清液,采用镍离子螯合磁珠来纯化大肠杆菌总蛋白中的褐牙鲂ChgH重组蛋白。将装有2 mL磁珠悬浮液的离心管置于磁性分离器上,进行磁性分离,移去保存液,加入5mL Binding Buffer (20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 5~50 mM 咪唑)到上述装有磁珠的离心管中,移液枪吹打数次,使磁珠重新悬浮,进行磁性分离,去除上清。将上述预处理的磁珠与粗蛋白样品充分混合悬浮后,置于摇床上室温旋转混合孵育30 min,磁性分离,移出溶液已备检测。加入10mL Washing Buffer (20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 50~100 mM 咪唑)到磁珠管中,重新吹打混匀,磁性分离,收集清洗液已备检测,重复上述步骤1次。再次加入10 mL Washing Buffer,重悬后转移至新管,加入1~10mL Elution Buffer (20 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM 咪唑)吹打混匀,磁性分离,收集洗脱液即获得高纯度的卵壳前体蛋白重组蛋白。

[0018] (2) 所述(二)制备褐牙鲂卵壳前体蛋白多克隆抗体方法如下:

将70 μg的卵壳前体蛋白纯品和等体积的弗式完全佐剂乳化后注射入小鼠腹腔,两周后用同样剂量的卵壳前体蛋白纯品与弗氏不完全佐剂充分乳化后对Balb/c小鼠进行加强免疫,一周后尾静脉注射卵壳前体蛋白纯品进行加强免疫,三天后取小鼠的血清,利用Protein G亲和层析柱从腹水上清中纯化获得免疫球蛋白IgG;纯化的抗体经PBS缓冲液透析24 h,即获得褐牙鲂卵壳前体蛋白多克隆抗体;

(3) 所述(三)制备FITC标记的褐牙鲂卵壳前体蛋白多克隆抗体制备方法如下:

将纯化所得蛋白(浓度≥1 mg/mL)置于交联反应液(7.56g NaHCO₃,1.06g Na₂CO₃,7.36g NaCl,1 L ddH₂O)中4℃透析三次,至pH=9.0;将FITC溶于交联反应液中,浓度为1mg/mL;按蛋白质:FITC=1mg:150μg的比例称取FITC缓慢加入于抗体溶液中,5~10 min内加完,避免粘壁;边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,暗处4℃反应8 h;用半饱和的硫酸铵将标记蛋白沉淀分离,除去未结合的荧光素,将交联物在PBS中透析四次以上,至透析液清亮,即获得FITC标记的褐牙鲂卵壳前体蛋白多克隆抗体。

[0019] 最后,将FITC标记的褐牙鲂卵壳前体蛋白多克隆抗体1支构成本发明的试剂盒。

[0020] 本发明的检测褐牙鲂卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒,可用于海洋环境雌激素污染的检测。使用时分为以下步骤:

1) 将石蜡切片置于二甲苯中脱蜡5 min,倾去二甲苯,置于新的二甲苯溶液中5 min。

[0021] 2) 将脱蜡后的组织切片依次转入50 %二甲苯+50 %酒精、100 %酒精、95 %酒精、90 %酒精、80 %酒精、70 %酒精、50 %酒精和蒸馏水中各浸泡5 min使组织切片逐渐水化。

[0022] 3) 将水化后的组织切片置于3% H_2O_2 +80%甲醇中静置10 min,PBS洗2-3次,每次5 min,以清除内源性 H_2O_2 酶。

[0023] 4) 将组织切片浸入枸橼酸盐缓冲液中,微波炉加热至沸腾后断电,间隔10-15 min,反复1-2次,冷却后PBS洗3遍,每次5 min。

[0024] 5) 用5% BSA室温封闭1 h,甩去多余液体不洗。

[0025] 6) 加入FITC标记好的褐牙卵壳前体蛋白多克隆抗体,4℃孵育过夜。

[0026] 7) 次日,室温复温45 min,荧光显微镜下观察和拍照。

序列表

<110> 中国海洋大学

<120> 检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用

<160> 2

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> 褐牙鲈 (Paralichthys olivaceus)

<400> 1

cacccaagtt ttcaagtctc agcagtc 27

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> 褐牙鲈 (Paralichthys olivaceus)

<400> 2

ccgcttactg agcagggtca atgaat 26

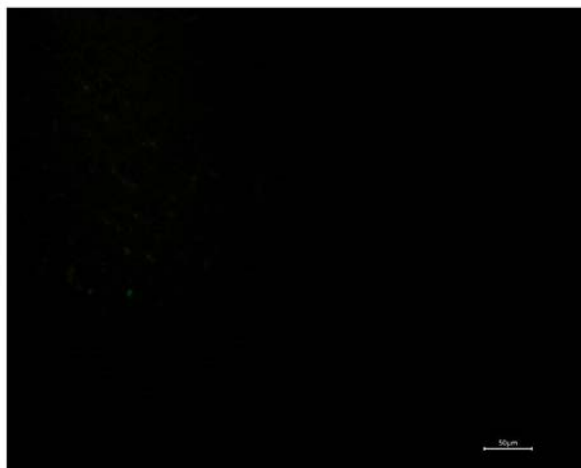


图1

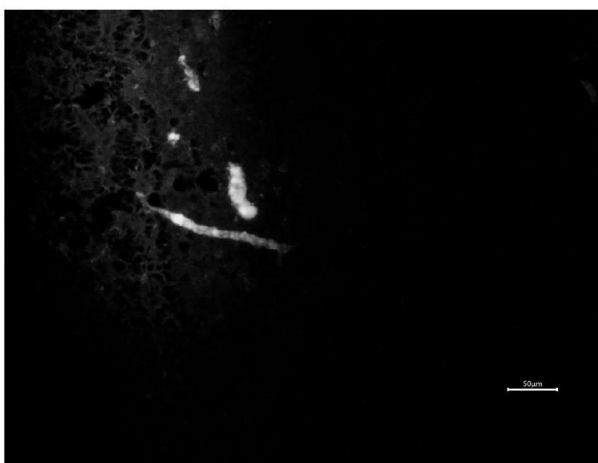


图2

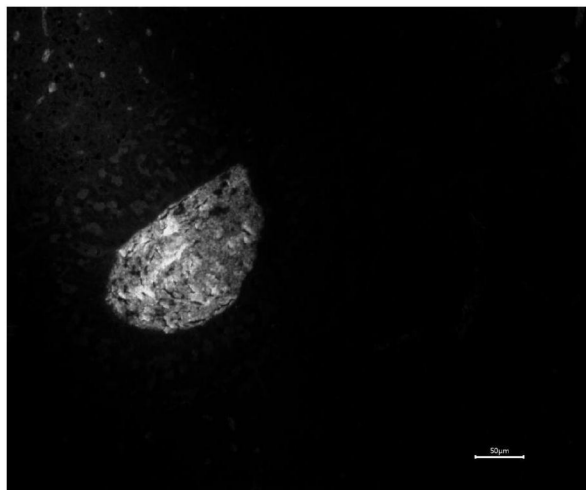


图3

专利名称(译)	检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN109884324A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201910070323.0	申请日	2019-01-25
[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	王军 张振忠 汝少国 王蔚		
发明人	王军 张振忠 汝少国 王蔚		
IPC分类号	G01N33/74 G01N33/68 G01N33/533		
代理人(译)	张中南 邱岳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒及应用。通过原核表达的方法制备褐牙鲈卵壳前体蛋白，免疫小鼠开发褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体，并将FITC标记到纯化的多克隆抗体上；由标记了FITC的褐牙鲈卵壳前体蛋白多克隆抗体构建检测褐牙鲈卵壳前体蛋白的免疫荧光试剂盒。本发明不仅可用于检测褐牙鲈鱼体中卵壳前体蛋白的产生，还可以对卵壳前体蛋白在肝脏组织中的部位进行定位。与之前的免疫组化相比，本发明步骤较少，节约时间，检测本底值低，为海洋环境雌激素的筛选、检测和生态环境风险评价提供重要工具。

