



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103033631 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 10

(21) 申请号 201210559592. 1

(22) 申请日 2012. 12. 20

(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

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

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

(57) 摘要

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。其试剂盒含有金鱼卵黄脂磷蛋白纯品与鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。其制备方法为首先纯化出金鱼卵黄脂磷蛋白,通过免疫小鼠制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清,进一步纯化获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。本发明的试剂盒可以用于环境雌激素类物质的筛选以及水环境受环境雌激素污染状况的检测,能够灵敏、方便的定性检测鱼类血液、整体匀浆液、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白,该试剂盒不仅可以用于鲤科鱼类卵黄原蛋白定性检测,对种缘关系较远的鱼类卵黄原蛋白具有同样的检测敏感度。因为该试剂盒最大的优势在于具有非常广泛的应用范围,并且最低检出限可达 100ng/ml。



1. 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,包括一个箱体,该箱体内装有:1)PVDF膜2张;2)阴性对照血浆1支;3)辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支;4)封闭液、洗涤液、显色液各1支,所述的洗涤液为TBST;封闭液为含5%脱脂奶粉的TBST;显色液为含0.06%(m/V)3'-二氨基联苯胺(DAB)的10mM Tris-HCl;其特征在于它还装有5)金鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支;6)鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体1支。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于所述的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为100 μg/ml的金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

3. 如权利要求1所述的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,其特征在于所述的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品的制备方法如下:

取卵黄形成后期的雌性金鱼卵巢组织,去除结缔组织,收集鱼卵,加入3倍体积4℃预冷的匀浆缓冲液混合,在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆,4℃,10000g离心20分钟,收集上清液;向上清液中缓缓加入(NH₄)₂SO₄粉末至70%的饱和度,盐析过液;10小时后,在4℃下,以8000g离心10分钟,弃去上清,将沉淀重新溶解于25mM Tris-HCl(内含0.07M NaCl, pH7.5),获得卵匀浆提取液;

取1ml卵匀浆提取液加入Sephacryl S-300层析柱,用含0.07M NaCl的25mM Tris-HCl(pH7.5)洗脱,收集含有金鱼卵黄脂磷蛋白的样品用于离子交换层析(DEAE-Sepharose Fast Flow),用分别含0.07M、0.1M、0.2M、0.3M和1.0M NaCl的Tris-HCl缓冲液(25mM, pH7.5)进行不连续洗脱,收集0.2M脱组分,鉴定为金鱼卵黄脂磷蛋白纯品。

4. 如权利要求3所述的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,其特征在于所述的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体的制备方法如下:

采用腹腔注射雄性小鼠的方式,每只小鼠注射纯化的金鱼卵黄脂磷蛋白50 μg,注射前将等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀;此后,在第14、21、28、35、38天分别注射,注射剂量为50 μg,注射前将等体积抗原与弗氏不完全佐剂充分混匀;第40天采血,采血前一天停食;采用眼眶取血法取血,获得抗血清用于制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体;

采用硫酸铵沉淀的方法制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体:首先将鼠抗血清与阴性对照血浆2:1混合,4℃摇晃过夜,离心去除非特异性的抗体,然后加入(NH₄)₂SO₄粉末至20%的饱和度,4℃摇晃2个小时,离心除去纤维蛋白;加50%的饱和硫酸铵,4℃摇晃2个小时,离心除去白蛋白;加33%的饱和硫酸铵,4℃摇晃2个小时;4℃,8000g离心10分钟,即获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。

5. 权利要求1所述的试剂盒,其特征在于该试剂盒在环境雌激素类化合物的筛选,以及在水环境受雌激素类物质污染状况检测中的应用。

6. 利用权利要求1所述的的试剂盒定性检测鱼类卵黄原蛋白的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 将试剂盒中的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品、阴性对照血浆和待测的雄鱼样品稀释后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,所述的待测的雄鱼样品包括血浆、匀浆液、体表黏液、肝脏组织及肝细胞培养液;

2) 把电流凝胶上的蛋白转印到PVDF膜;

3) 用封闭液封闭PVDF膜的非特异性结合位点,4℃孵育过夜,弃去封闭液;

4) 加入用封闭液按1:300的体积比稀释的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体,室温下

震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

5) 加入用封闭液按 1:500 的体积比稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

6) 加入显色液,待蛋白质条带清晰后,弃去显色液,用蒸馏水终止显色反应, PVDF 膜拍照后于避光处保存;

7) 在雄鱼样品中发现有显色条带,表明该鱼生活的水域受到了环境雌激素类物质的污染。

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

技术领域

[0001] 本发明属于生态检测领域,具体涉及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,及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 近年来,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。为了减少环境雌激素对生物体及人类的危害,建立快捷有效的筛选方法,从环境污染物中筛选出具有环境雌激素效应的化学物质,已成为当前研究的热点。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。

[0003] 卵黄原蛋白是卵黄蛋白的前体,是一种大分子量的糖磷脂蛋白。卵黄形成期,卵黄原蛋白在雌激素的刺激下由肝脏产生,随血液循环进入卵巢,被卵巢吸收后,在组织蛋白酶 D 的作用下,分解成卵黄脂磷蛋白、卵黄高磷蛋白和 β' -组分,大量储存于卵巢中,为卵细胞和早期胚胎的发育提供营养与免疫保护。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的含量可以评价环境化学物的雌激素作用。

[0004] 卵黄原蛋白的分离纯化是制备多克隆抗血清、定性定量检测鱼类卵黄原蛋白的基础。目前已经纯化获得了多种鱼类的卵黄原蛋白,并且利用其抗体用于环境雌激素类物质的检测。但研究证明,鱼类卵黄原蛋白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,甚至可能导致卵黄原蛋白丧失生物学活性;样品反复冻融也会增加卵黄原蛋白降解程度。此外,卵黄原蛋白的降解会对检测结果造成影响,因为卵黄原蛋白的降解产物会比卵黄原蛋白表现出更多的免疫原性,故卵黄原蛋白的不稳定性使得其不适合用于定量测定中的标准蛋白。而卵黄原蛋白在卵中的主要酶解产物——卵黄脂磷蛋白 (lipovitellin, Lv),对温度相对稳定,并且与卵黄原蛋白具有相同的免疫原性,可用于卵黄原蛋白的检测。本实验室已经证实金鱼卵黄脂磷蛋白多抗可以与种缘关系较远的美国红鱼、石斑的卵黄原蛋白具有较强的交叉反应,其检测效果不亚于对鲤科鱼类的检测。因此可以利用卵黄脂磷蛋白代替卵黄原蛋白,制备多克隆抗血清,用于环境雌激素的检测。

[0005] 目前国内外已经建立了多种鱼类卵黄原蛋白的酶联免疫吸附试剂盒和放射性免疫试剂盒,但这些试剂盒对仪器的要求较高,并且实验过程中影响因素较多;在不同物种之间,卵黄原蛋白的免疫学和结构特性具有较大的差异,即使种属关系相近的鱼类 Vtg 也具有较强的异质性,通常卵黄原蛋白抗体只能用于特定鱼种卵黄原蛋白的检测,而与其它鱼种没有或仅有非常弱的交叉反应性,这就意味着需要开发种特异性的抗体;并且由于鱼类地理分布的差异较大,需要制备使用方便、对仪器要求不高,能够克服种间差异性,应用范围较广的鱼类卵黄原蛋白的检测试剂盒。因此,开发出一种利用卵黄脂磷蛋白多克隆抗体检测鱼类卵黄原蛋白的试剂盒,将具有广泛的应用前景和科学价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供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,以克服现有技术的不足。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供上述试剂盒的制备方法及其应用,以克服目前检测鱼类卵黄原蛋白技术的不足。

[0008] 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,包括一个箱体,该箱体内装有:1)PVDF膜2张;2)阴性对照血浆1支;3)辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支;4)封闭液、洗涤液、显色液各1支,所述的洗涤液为TBST;封闭液为含5%脱脂奶粉的TBST;显色液为含0.06%(m/V)3'-二氨基联苯胺(DAB)的10mM Tris-HCl;其特征在于它还装有5)金鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支;6)鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体1支。

[0009] 上述金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为100 μ g/ml的金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

[0010] 上述定性检测鱼类卵黄原蛋白的试剂盒制备方法,包括以下步骤:1)制备金鱼卵黄脂磷蛋白纯品;2)利用步骤1)得到的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体;3)将步骤1)得到的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品1支、步骤2)得到的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗血清1支、PVDF膜2张,以及封闭液、洗涤液、显色液、阴性对照血浆和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗1支共同装入箱体,得到鱼类卵黄原蛋白定性检测的试剂盒。

[0011] 上述试剂盒在环境雌激素类化合物的筛选,以及在水环境受雌激素类物质污染状况检测中的应用。

[0012] 本发明的优点

[0013] 本发明的试剂盒利用抗原抗体之间的特异性结合能力,能够灵敏、方便地定性检测不同鱼类血液、整体匀浆体、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白。

[0014] 与现有技术相比本发现有两大优势。首先,卵黄脂磷蛋白克服了卵黄原蛋白易降解的性质,卵黄原蛋白在纯化和保存过程中的易降解性已经被广泛证实,即使在低温纯化过程中加入抑制蛋白降解的蛋白酶抑制剂(如抑酶肽、PMSF)的情况下,卵黄原蛋白的降解仍难以避免。此外,本发明的有益效果是显著地扩大了抗体的应用范围。以卵黄原蛋白为抗原制备的抗体通常只能用于本鱼种卵黄原蛋白的检测,这就需要花费大量的人力、财力去纯化各种鱼类的卵黄原蛋白,并制备种特异性的抗体,而本发明以卵黄脂磷蛋白为抗原免疫动物,其抗体除用于金鱼卵黄原蛋白的检测外,还可以扩大到鲤科鱼类卵黄原蛋白的检测,甚至对美国红鱼、石斑等种缘关系很远的鱼类卵黄原蛋白仍有很高的检测敏感度(对它们的最低检出限同为100ng/ml)。综上,本试剂盒以稳定性较好的金鱼卵黄脂磷蛋白代替卵黄原蛋白,避免了因卵黄原蛋白降解而造成的检测结果偏差,并且扩大了抗体的应用范围。

附图说明

[0015] 图1为本发明的金鱼卵黄原蛋白纯品与卵黄脂磷蛋白纯品的电泳图谱;

[0016] 图2为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对金鱼卵黄原蛋白的定性检测结果;

- [0017] 图 3 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对鲤鱼卵黄原蛋白的定性检测结果；
- [0018] 图 4 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对鲫鱼卵黄原蛋白的定性检测结果；
- [0019] 图 5 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对斑马鱼匀浆液的定性检测结果；
- [0020] 图 6 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对美国红鱼卵黄原蛋白的定性检测；
- [0021] 图 7 为本发明的金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体对石鲮卵黄原蛋白的定性检测结果。

具体实施方式：

[0022] 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，包括一个盒体，该盒体内装有：1) PVDF 膜 2 张；2) 阴性对照血浆 1 支；3) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支；4) 封闭液、洗涤液、显色液各 1 支，所述的洗涤液为 TBST；封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST；显色液为含 0.06% (m/V) 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 的 10mM Tris-HCl；其特征在于它还装有 5) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支；6) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 1 支。

[0023] 上述金鱼卵黄脂磷蛋白纯品为 100 μ g/ml 的金鱼卵黄脂磷蛋白溶液。

[0024] 上述试剂盒中的 5) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品，是以如下方法制备的：

[0025] 取卵黄形成后期的雌性金鱼卵巢组织，去除结缔组织，收集鱼卵，加入 3 倍体积 4℃ 预冷的匀浆缓冲液 (25mM Tris-HCl, 内含 70mM NaCl, 10mM EDTA 和 1mM PMSF, pH7.5) 混合，在冰浴条件下用玻璃匀浆器匀浆，4℃, 10000g 离心 20 分钟，收集上清液；向上清液中缓缓加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 70% 的饱和度，盐析过液；10 小时后，在 4℃ 下，以 8000g 离心 10 分钟，弃去上清，将沉淀重新溶解于 25mM Tris-HCl (内含 0.07M NaCl, pH7.5)，获得卵匀浆提取液；

[0026] 取 1ml 卵匀浆提取液加入 Sephacryl S-300 层析柱，用含 0.07M NaCl 的 25mM Tris-HCl (pH7.5) 洗脱，收集含有金鱼卵黄脂磷蛋白的样品用于离子交换层析 (DEAE-Sepharose Fast Flow)，用分别含 0.07M、0.1M、0.2M、0.3M 和 1.0M NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (25mM, pH7.5) 进行不连续洗脱，收集 0.2M 脱组分，鉴定为金鱼卵黄脂磷蛋白纯品，-80℃ 保存。

[0027] 上述试剂盒中的 6) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体，是以如下方法制备的：

[0028] 采用腹腔注射雄性小鼠的方式，每只小鼠注射纯化的金鱼卵黄脂磷蛋白 50 μ g (等体积抗原与弗氏完全佐剂充分混匀)；此后，在第 14、21、28、35、38 天分别注射，注射剂量为 50 μ g (等体积抗原与弗氏不完全佐剂充分混匀)；第 40 天采血，采血前一天停食。采用眼眶取血法取血，获得抗血清用于制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体；

[0029] 采用硫酸铵沉淀的方法制备鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体。首先将鼠抗血清与阴性对照血浆 2:1 混合，4℃ 摇晃过夜，离心去除非特异性的抗体，然后加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末至 20% 的饱和度，4℃ 摇晃 2 个小时，离心除去纤维蛋白；加 50% 的饱和硫酸铵，4℃ 摇晃 2 个小时，离心除去白蛋白；加 33% 的饱和硫酸铵，4℃ 摇晃 2 个小时；4℃, 8000g 离心 10 分钟，即获得鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体，-80℃ 保存。

[0030] 经过以上操作,得到的定性检测鲤科鱼类卵黄脂磷蛋白的试剂盒具体组成如下:

[0031] 1) PVDF 膜 2 张;

[0032] 2) 金鱼卵黄脂磷蛋白纯品 1 支,使用前用 PBS 稀释至 $1 \mu\text{g/ml}$;

[0033] 3) 阴性对照血浆 1 支,使用前用 PBS 按 1:100 倍的体积比稀释;

[0034] 4) 鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体 1 支,使用前用封闭液按 1:300 的体积比稀释;

[0035] 5) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 1 支,使用前用封闭液按 1:500 的体积比稀释;

[0036] 6) 封闭液、洗涤液、显色液各 1 支,所述的洗涤液为 TBST(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、0.05% Tween-20, pH7.5);封闭液为含 5% 脱脂奶粉的 TBST;显色液为含 0.06%(m/V) 3'-二氨基联苯胺(DAB)的 10mM Tris-HCl,使用前向显色液中加入 0.05%(v/v) 双氧水。

[0037] 本发明的试剂盒可用于环境雌激素类物质的筛选,以及水环境受环境雌激素污染状况的检测。

[0038] 以本发明的试剂盒定性检测鱼类卵黄原蛋白的方法,具体包括以下步骤:

[0039] 1) 将试剂盒中的金鱼卵黄脂磷蛋白纯品、阴性对照血浆和待测的雄鱼样品(样品包括血浆、匀浆液、体表黏液、肝脏组织及肝细胞培养液等)稀释后进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;

[0040] 2) 把电流凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜;

[0041] 3) 用封闭液封闭 PVDF 膜的非特异性结合位点,4℃ 孵育过夜,弃去封闭液;

[0042] 4) 加入用封闭液按 1:300 的体积比稀释的鼠抗金鱼卵黄脂磷蛋白多克隆抗体,室温下震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

[0043] 5) 加入用封闭液按 1:500 的体积比稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温下震荡孵育 4 小时,弃去溶液,用洗涤液洗涤 PVDF 膜 3 次;

[0044] 6) 加入显色液,待蛋白质条带清晰后,弃去显色液,用蒸馏水终止显色反应, PVDF 膜拍照后于避光处保存;

[0045] 7) 在雄鱼样品中发现有显色条带,表明该鱼生活的水域受到了环境雌激素类物质的污染。

[0046] 如附图 1 所示,本发明的金鱼卵黄原蛋白纯品与卵黄脂磷蛋白纯品的电泳图谱,可见金鱼卵黄脂磷蛋白的稳定性要优于卵黄原蛋白。

[0047] 如附图 2-7 所示,其结果依次为图 2 对金鱼卵黄原蛋白的定性检测结果;图 3 对鲤鱼卵黄原蛋白的定性检测结果;图 4 对鲫鱼卵黄原蛋白的定性检测结果;图 5 对雌性斑马鱼匀浆液的定性检测结果;图 6 对美国红鱼卵黄原蛋白的定性检测;图 7 对石鲮卵黄原蛋白的定性检测结果。可以看到在 PVDF 膜上均出现了明显的条带,即本发明的试剂盒及其检测方法在定性检测鱼类卵黄原蛋白方面有很好的应用。

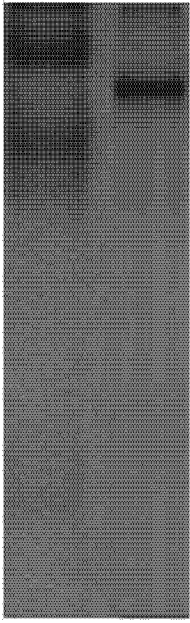


图 1

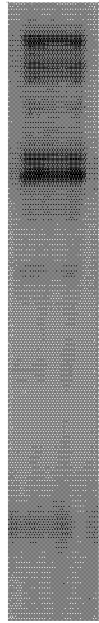


图 2



图 3

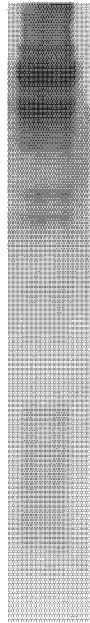


图 4



图 5

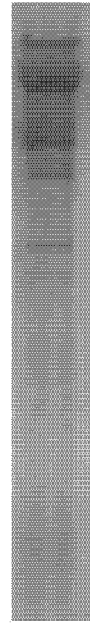


图 6

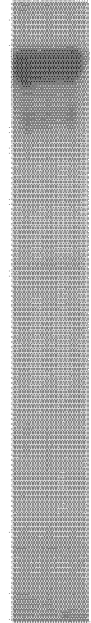


图 7

专利名称(译)	利用卵磷脂蛋白抗体定性检测鱼类卵黄原蛋白的试剂盒		
公开(公告)号	CN103033631A	公开(公告)日	2013-04-10
申请号	CN201210559592.1	申请日	2012-12-20
[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		
代理人(译)	张中南		
其他公开文献	CN103033631B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

利用卵磷脂蛋白抗体定性检测鱼类卵黄原蛋白的试剂盒。其试剂盒含有金鱼卵磷脂蛋白纯品与鼠抗金鱼卵磷脂蛋白多克隆抗体。其制备方法为首先纯化出金鱼卵磷脂蛋白，通过免疫小鼠制备鼠抗金鱼卵磷脂蛋白多克隆抗血清，进一步纯化获得鼠抗金鱼卵磷脂蛋白多克隆抗体。本发明的试剂盒可以用于环境雌激素类物质的筛选以及水环境受环境雌激素污染状况的检测，能够灵敏、方便的定性检测鱼类血液、整体匀浆液、体表粘液、肝脏组织及肝细胞培养液中的卵黄原蛋白，该试剂盒不仅可以用于鲤科鱼类卵黄原蛋白定性检测，对种缘关系较远的鱼类卵黄原蛋白具有同样的检测敏感度。因为该试剂盒最大的优势在于具有非常广泛的应用范围，并且最低检出限可达100ng/ml。

