

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610112100.9

[43] 公开日 2007 年 2 月 14 日

[11] 公开号 CN 1912624A

[22] 申请日 2006.8.31

[21] 申请号 200610112100.9

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区清华东路 17 号
136 信箱

[72] 发明人 黄昆仑 许文涛 罗云波 芦 云
杨加佳

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称

转基因植物中 GOX 蛋白的酶联免疫检测方法
及其专用试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种转基因植物中 GOX 蛋白的检测方法，更确切地说它是利用酶联免疫吸附方法来检测转 GOX 基因作物及其加工产品中的 GOX 蛋白，属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是：以 GOX 蛋白为抗原进行动物免疫，获得了特异性的多克隆抗体和单克隆抗体；被检样品经初步处理后，进行酶联免疫吸附检测，以确定其中的 GOX 蛋白含量。本发明还提供了所述方法的专用试剂盒。

1、一种利用酶联免疫吸附检测转基因植物样品中 GOX 蛋白的方法根据权利要求所述方法，它包括如下步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 制备酶标抗体：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白抗体混合，采用过碘酸纳标记法制备酶标抗体；

(3) 制备 GOX 抗体；

(5) 包被酶标板；

(6) 酶联免疫吸附检测：将洗脱液加入经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；显色、终止；用酶标仪读取 OD 值；

(7) 绘制标准曲线；

(8) 根据标准曲线对洗脱液中的 GOX 蛋白含量进行定量计算。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中样品前处理采用称取待测植物组织，经超声波破碎；离心，取上清液过滤；滤过液冻存待测。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备酶标抗原采用将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备多克隆 GOX 抗体的方法采用将新西兰白兔接种免疫，免疫抗原为纯化的 GOX 蛋白，放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 GOX 抗体的溶液，冻存备用；其中制备单克隆 GOX 抗体的方法采用将小鼠接种免疫，免疫抗原为纯化的 GOX 蛋白，采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合；筛选杂交瘤细胞，获得完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其中包被酶标板采用将 GOX

抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其中酶联免疫吸附检测采用将样品液加在经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗体，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

7、一种用于权利要求 1--6 所述之任一之任一方法的专用试剂盒，其特征在于它含有：

A 试剂：标准 GOX 蛋白试剂；

B 试剂：酶标抗体试剂；

J 试剂：GOX 抗体 Ig G 预包被板一块，48T/96T；

8、根据权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于它还含有：

C 试剂：抗原稀释液；

D 试剂：抗体稀释液

E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；

F 试剂：邻苯二胺试剂；

G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；

H 试剂：30%H₂O₂；

I 试剂：硫酸溶液；

J 试剂：GOX 抗体 Ig G 预包被板一块，48T/96T。

转基因植物中 GOX 蛋白的酶联免疫检测方法及其专用试剂盒

技术领域

本发明属免疫学检测领域，涉及生物技术产品，具体涉及一种转基因植物中 GOX 蛋白的酶联免疫检测方法及其专用试剂盒。

背景技术

目前，转基因作物涉及的食品原料有大豆、玉米、油菜、棉花、番茄、马铃薯、西葫芦、番木瓜、甜椒等。2000 年转基因大豆、玉米、油菜、棉花占转基因作物种植面积的 99.99% 以上，占全球种植面积的 16%。在转基因作物农艺性状上表现出抗除草剂转基因作物所占比例最大，其次是抗虫，再次是双抗（抗除草剂和抗虫）。

GOX 基因是抗除草剂基因，目前也已被广泛应用。目前将 *GOX* 基因作为抗性基因和/或标记基因的转基因作物约占总转基因作物的 8%，转入 *GOX* 基因的作物已经有小麦，玉米，棉花，油菜等多种作物。

随着转基因食品的快速发展，如何正确的评价转基因食品，不仅关系到我国人民的身体健康，而且也关系到我国生物技术在食品工业中的可持续发展。特别在我国加入 WTO 以后，国外转 *GOX* 基因的作物和食品大量进入我国，转 *GOX* 基因的食品检测技术是转基因食品安全性评价的重要技术平台，其研究具有重要的意义。

目前在我国还没有见到有关转 *GOX* 基因食品检测技术的研究报道。在国际上转 *GOX* 基因食品检测最常用的技术是 PCR 技术，但在 PCR 反应中，许多因素会影响反应的进行，导致反应效率下降、非特异性片段的扩增、假阳性和阴性的出现等。

发明内容

本发明目的在于提供一种样品前处理简单，灵敏度高，特异性强，快速高效，适于大批量样品筛选的 GOX 蛋白检测方法；并开发出结构简单，使用方便，价格便宜，便于携带的 GOX 蛋白检测试剂盒；从而解决了对转 *GOX* 基因作物及其加工产品从蛋白水平上进行定量检测的需求。

本发明提供了一种从蛋白质水平上对转 *GOX* 基因作物中的外源蛋白质 GOX 的检测方法，其特征在于，先对待测植物样品进行样品前处理，再通过酶联免疫吸附方法来定量检测 GOX 蛋白。

所述方法包括如下步骤：

1、一种利用酶联免疫吸附检测样品中 GOX 蛋白的方法根据权利要求所述方法，它包括如下步骤：

- (1) 样品前处理；
- (2) 制备酶标抗体：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白抗体混合，采用过碘酸纳标记法制备酶标抗体；
- (3) 制备 GOX 抗体；
- (5) 包被酶标板；
- (6) 酶联免疫吸附检测：将样品液加入经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗体，温育后洗涤拍干；显色、终止；用酶标仪读取 OD 值；
- (7) 绘制标准曲线；
- (8) 根据标准曲线对洗脱液中的 GOX 蛋白含量进行定量计算。
优选地，样品前处理采用称取待测植物组织，经超声波破碎；离心，取上清液过滤；滤过液冻存待测。
优选地，制备酶标抗体时采用过碘酸纳法将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白抗体交联获得“酶标记抗体”。
优选地，制备多克隆 GOX 抗体的方法采用将新西兰白兔接种免

疫，免疫抗原为纯化的 GOX 蛋白，放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，离心后得含有多克隆 GOX 抗体的溶液，冻存备用；其中制备单克隆 GOX 抗体的方法采用将小鼠接种免疫，免疫抗原为纯化的 GOX 蛋白，采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合；筛选杂交瘤细胞，获得完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

优选地，包被酶标板采用将 GOX 抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

优选地，酶联免疫吸附检测采用将样品液加在经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

本发明还提供了一种用于所述方法的试剂盒，其特征在于它含有：

A 试剂：标准 GOX 蛋白试剂；

B 试剂：酶标抗体试剂；

J 试剂：GOX 抗体 Ig G 预包被板一块，48T/96T；

优选地，所述的试剂盒还含有：

C 试剂：抗原稀释液；

D 试剂：抗体稀释液

E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；

F 试剂：邻苯二胺试剂；

G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；

H 试剂：30%H₂O₂；

I 试剂：硫酸溶液；

J 试剂：GOX 抗体 IgG 预包被板一块，48T/96T.

本发明技术方案详述如下：

(1) 称取 2g 植物组织，加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5)，经超声波破碎；然后 12000rpm/min 离心 30 min，重复两次以去除不溶性的组织碎片，抽取上清液经滤膜过滤。滤过液-20℃冻存待测；整个操作过程要避免过热导致蛋白变性。

(2) 制备多克隆 GOX 抗体

a. 免疫用抗原：免疫剂量每次 1mg/ml GOX 蛋白，首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化。

b. 动物免疫：将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔两周，一共免疫 5 次；在最后一次直接肌肉注射，一周后从兔耳静脉采血以检测抗血清效价；之后颈动脉放血。

c. 分离血清：以 30%-60% 的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，之后将过柱获得的液体用 Ph 7.4 含 0.15 mol/L NaCl 的 PBS (磷酸盐缓冲液) 连续透析 3 d，每天换液 2 次，取出透析液进行离心后得含有多克隆 GOX 抗体的溶液；-70℃保存备用。

(3) 制备单克隆 GOX 抗体

将纯化的 GOX 蛋白作为免疫抗原；采用小鼠作为免疫动物，免疫抗原剂量为 50ug(0.1ml)加等体积的完全福式佐剂乳化，进行首次免疫；一月后，取同等量免疫抗原加不完全福式佐剂，乳化，进行加强免疫，二免后，十天采血，测定抗体效价，取脾细胞；将脾细胞按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合；采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；在小鼠腹腔内注射一定量的杂交瘤细胞，采集腹水，经提纯后待用。

(4) 制备酶标抗体：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白抗体混合，采用过碘酸钠标记法制备酶标抗体；

将 7.5mgHRP 用 0.5ml 蒸馏水溶解，混匀后于 4 度放置 30min；加入 0.16M 的乙二醇 0.5ml 混匀后于室温放置 30min；加入 GOX 蛋白抗体 0.5ml(约 6-7mg)，混合后装袋透析，用 0.05M, pH9.6 的碳酸

缓冲液透析过夜；次日吸出透析物，加 NaBH4 溶液 0.2ml(5mg/ml) 置于冰箱 2 个小时；将透析物用 50% 硫铵沉淀纯化，再用 pH7.4,0.02M PBS 透析；去除不溶物即得酶标抗体，分装后于-80 度冰柜保存。

(5) 包被酶标板：将抗体包被在酶标板上，100ul/孔，放入 4℃ 冰箱过夜；再加入 E 洗涤液，250ul/孔，洗涤 3 次，每次 3 min；放在吸水纸上拍干。

(6) 在酶标板中加入待测样品液，37℃温育 0.5h，之后洗涤拍干；加入 100ul 酶标抗体溶液，37℃温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul 终止液；测定：目测后，酶标仪读取各孔 OD 值。

(7) 绘制标准曲线：用 GOX 蛋白标准品配制 GOX 蛋白浓度梯度溶液，经步骤 (6)，获取各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；

(8) 根据标准曲线对样品洗脱液中的 GOX 蛋白含量进行定量计算。

GOX 蛋白检测试剂盒的组建：

A 试剂：标准 GOX 蛋白试剂；B 试剂：酶标抗体试剂；C 试剂：抗原稀释液；D 试剂：抗体稀释液；E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；F 试剂：邻苯二胺试剂；G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；H 试剂：30%H₂O₂；I 试剂：硫酸溶液；J 试剂：GOX 抗体 Ig G 预包被板一块，48T/96T

本试剂盒是先对转基因植物样品进行前处理，再通过酶联免疫吸附方法来检测 GOX 蛋白。

本发明运用酶联免疫技术（ELISA）实现了 GOX 蛋白的特异性检测，从而解决了对转 GOX 基因作物及其加工产品从蛋白水平上进行定量检测的需求。本发明是目前国内外首次实现对 GOX 蛋白的定量检测技术，该项研究填补了国内外该领域的研究空白。I ELISA 试剂盒检测限低，且灵敏快速，前处理简单，结果重复性好，适于大

批量样品的筛选。

使用 ELISA 检测技术对转基因作物 GOX 蛋白可以达到 0.5% 的检测限。

本发明检测方法有如下优点：

1. 灵敏度高，检测限低，结果重复性好；
2. 特异性强：ELISA 方法建立在抗体和抗原的特异性结合，且所得抗体交叉反应率极低；
3. 检测成本低廉，无需大型仪器设备，适于推广；
4. 样品预处理简单，无需无菌化处理，样品提取方便快捷；
5. 通过酶标仪判读，结果具有客观性和不可更改性；
6. 简单易行，操作人员只需最基本的实验知识，可标准化为产品；
7. 检测时间短，整个操作过程不到 2.5 个小时；
8. 可以进行大批量检测。

附图说明

图 1：GOX 蛋白的检测标准曲线图。

图 2：基因油菜 GT73 的 ELISA 检测结果图。

具体实施方式

下面结合具体实例，进一步阐述本发明。应理解，这些实例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。

实施例 1：

1、样品前处理：

分别称取转基因玉米 GT73 的叶片组织 2g, 加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5)，经超声波破碎。然后 12000rpm/min 离心 30 min，重复两次以去除不溶性的组织碎片，抽取上清液经孔径为 3 MM 的 whatman 滤膜过滤。滤过液-20℃冻存待测；整个操作过程要避免过

热导致蛋白变性。

2) 制备酶标抗体: 将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 GOX 蛋白抗体混合, 采用过碘酸纳标记法制备酶标抗体;

(3) 制备多克隆 GOX 抗体。

a. 免疫用抗原: 免疫剂量每次 1mg/ml GOX 蛋白, 首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化, 加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化。b. 动物免疫: 将新西兰白兔饲养数周后接种免疫, 每次免疫间隔两周, 一共免疫 5 次; 在最后一次直接肌肉注射, 一周后从兔耳静脉采血以检测抗血清效价; 之后颈动脉放血。c. 分离血清: 以 30%-60%的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白, 之后将过柱获得的液体用 Ph 7.4 含 0.15 mol/L NaCl 的 PBS(磷酸盐缓冲液)连续透析 3 d, 每天换液 2 次, 取出透析液进行离心后得含有多克隆 GOX 抗体的溶液; -70℃保存备用。

(4) 制备单克隆 GOX 抗体。

将纯化的 GOX 蛋白作为免疫抗原; 采用小鼠作为免疫动物, 免疫抗原剂量为 50ug(0.1ml)加等体积的完全福式佐剂乳化, 进行首次免疫; 一月后, 取同等量免疫抗原加不完全福式佐剂, 乳化, 进行加强免疫, 二免后, 十天采血, 测定抗体效价, 取脾细胞; 将脾细胞按 5:1 比例与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合; 采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞, 得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株; 在小鼠腹腔内注射一定量的杂交瘤细胞, 采集腹水, 经提纯后待用。

5、配制试剂

标准 GOX 试剂: GOX 标准品加稀释液(PBS 磷酸缓冲液, pH 7.4)混匀, 配成梯度溶液。

酶标抗体试剂: 酶标抗体加 10ml 酶标抗体稀释液 (PBS 磷酸缓冲液含 0.1% 明胶, pH 7.4) 溶解, 混匀。

洗涤液配制: 在含有 0.1% 吐温-20 的磷酸盐 (PBS) 固体中加入

200 ml 蒸馏水配制洗涤液，用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制：用 20 ml 醋酸钠-柠檬酸缓冲液稀释 40mg 邻苯二胺，再加入 6ul 30%H₂O₂，配制成底物混合液，现用现配。

6、包被酶标板：将抗体包被在酶标板上，100ul/孔，放入 4℃ 冰箱过夜；再加入洗涤液，250ul/孔，洗涤 3 次，每次 3 min；放在吸水纸上拍干。

7、在酶标板中加入待测样品液及标准 GOX 试剂，37℃温育 0.5h，之后洗涤拍干；加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul 终止液（硫酸溶液）；酶标仪读取各孔 OD 值。

8、绘制标准曲线：用 GOX 蛋白标准品所获各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；结果见图 1。

9、根据标准曲线对样品液中的 GOX 蛋白含量进行定量计算。

结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 GOX 浓度的下降而升高，将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，为了减少结果判断的误差，若检测样品的 OD 值比非转基因食品的检测值高出 0.3 则被判断为阳性，结果见图 2。

检测结果：转基因油菜 GT73 的检测限达到 0.5%。

实施例 2：

GOX 蛋白检测试剂盒的组建：

A 试剂：标准 GOX 蛋白试剂；B 试剂：酶标抗体试剂；C 试剂：抗原稀释液；D 试剂：抗体稀释液；E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；F 试剂：邻苯二胺试剂；G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；H 试剂：30%H₂O₂；I 试剂：硫酸溶液；J 试剂：GOX 抗体 Ig G 预包被板一块，48T/96T

实施例 3

1、样品前处理:

分别称取转基因 GT73 叶片组织 2g, 加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5), 经超声波破碎。然后 12000rpm/min 离心 30 min, 重复两次以去除不溶性的组织碎片, 抽取上清液经孔径为 3 MM 的 whatman 滤膜过滤。滤过液-20℃冻存待测; 整个操作过程要避免过热导致蛋白变性。

2、试剂的配制

标准 GOX 试剂: GOX 标准品加 C 试剂混匀, 配成梯度溶液。

酶标抗体试剂: B 试剂加 10ml D 试剂溶解, 混匀。

E 洗涤液配制: 在 E 试剂中加入 200 ml 蒸馏水配制 E 洗涤液, 用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制: 用 20 ml G 试剂稀释 40mg F 试剂, 再加入 6ul H 试剂, 配制成底物混合液, 现用现配。

A 试剂: 标准 GOX 蛋白试剂; B 试剂: 酶标抗体试剂; C 试剂: 抗原稀释液; D 试剂: 抗体稀释液; E 试剂: 含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体; F 试剂: 邻苯二胺试剂; G 试剂: 醋酸钠-柠檬酸缓冲液; H 试剂: 30%H₂O₂; I 试剂: 硫酸溶液; J 试剂: GOX 抗体 Ig G 预包被板一块, 48T/96T

3 、加样: 包被 GOX 抗体的酶标板中加入待测样品液和 GOX 标准溶液。37℃温育 0.5h。之后洗涤拍干。

酶标板上, 第 1 排标准对照, 在前 11 孔加入 GOX 梯度溶液, 第 12 孔加入空白对照, 加入量为 100ul。其余各孔则加入待测的样品洗脱液, 加入量 100ul。

以此表来表示酶标板, 表中空白格表示加样孔。

4、加酶: 加入 100ul 酶标抗体溶液, 37℃温育 0.5h; 洗涤拍干。

5、显色: 每孔加入 150ul 底物混合液, 室温显色 15min。

6、终止：每孔加入 50ul I 试剂。

7、测定：目测后，酶标仪读取各孔 OD 值。

8、结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 GOX 浓度的下降而升高，第 12 孔 OD 值应最高；将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，为了减少结果判断的误差，若检测样品的 OD 值比非转基因食品的检测值高出 0.3 则被判断为阳性。见图 2。

9、检测结果：而转基因油菜 GT73 的检测限达到 0.5%。

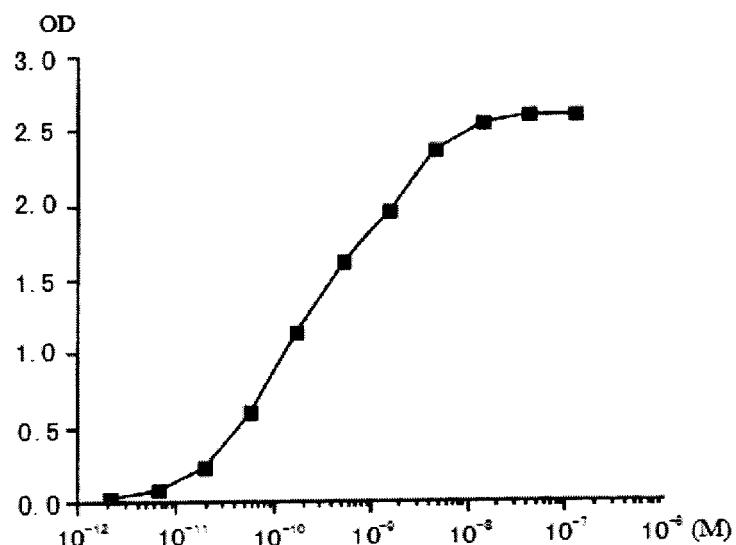


图 1

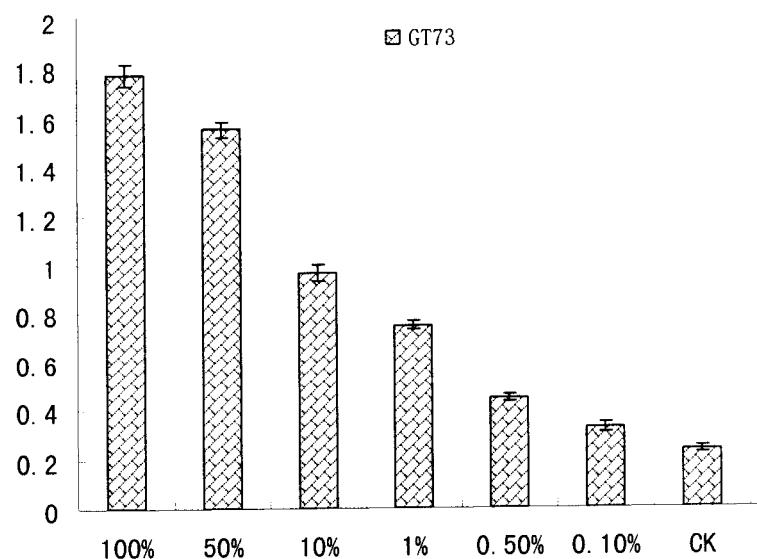


图 2

专利名称(译)	转基因植物中GOX蛋白的酶联免疫检测方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	CN1912624A	公开(公告)日	2007-02-14
申请号	CN200610112100.9	申请日	2006-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	黄昆仑 许文涛 罗云波 芦云 杨加佳		
发明人	黄昆仑 许文涛 罗云波 芦云 杨加佳		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种转基因植物中GOX蛋白的检测方法，更确切地说它是利用酶联免疫吸附方法来检测转GOX基因作物及其加工产品中的GOX蛋白，属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是：以GOX蛋白为抗原进行动物免疫，获得了特异性的多克隆抗体和单克隆抗体；被检样品经初步处理后，进行酶联免疫吸附检测，以确定其中的GOX蛋白含量。本发明还提供了所述方法的专用试剂盒。

