



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110133292 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201910482631.4

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2019.06.04

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.17083 2018.12.21

CGMCC NO.17084 2018.12.21

(71)申请人 中国农业科学院生物技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72)发明人 张哲 刘卫晓 金莞军 董美

高进 黄卫红 王迪

(74)专利代理机构 北京成实知识产权代理有限公司

公司 11724

代理人 叶立涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

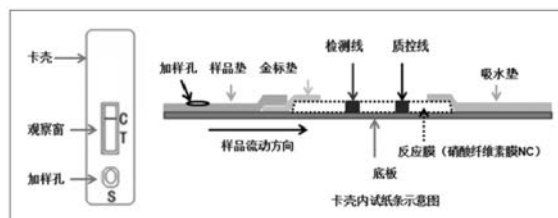
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡

(57)摘要

本发明公开了属于生物工程技术领域的一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡及其使用方法,所述胶体金免疫层析速测卡包括卡壳和卡壳内的试纸条,所述试纸条包括底板以及粘着在底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜和吸水垫,所述金标垫包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体-胶体金结合物。该速测卡特异性强,灵敏度高,并且,操作简便、快速、准确,适用于转基因水稻及其产品中抗除草剂蛋白Bar的现场快速检测以及安全性评价。



1. 一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,包括卡壳和卡壳内的试纸条,试纸条包括底板以及粘着在底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜和吸水垫,其特征在于,所述金标垫包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体-胶体金结合物。

2. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体由保藏号为CGMCC No.17083的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6分泌得到。

3. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述反应膜上设有包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体的检测线和包被羊抗鼠IgG的质控线。

4. 根据权利要求3所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述反应膜上设有的包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体由保藏号为CGMCC No.17084的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2分泌得到。

5. 根据权利要求3所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述检测线和质控线间隔0.5-1.0cm。

6. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述卡壳上设有加样孔和观察窗,所述加样孔设于样品垫上方,所述观察窗设于反应膜上方。

7. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述样品垫与金标垫、金标垫与反应膜、反应膜与吸水垫之间各设有1-2mm的重叠区。

8. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述底板为聚氯乙烯板,所述反应膜为硝酸纤维素膜。

9. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,所述样品垫由玻璃纤维膜或滤纸制成,所述吸水垫由滤纸制成。

10. 根据权利要求1所述用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡,其特征在于,包括以下步骤:

1) 待测样品前处理:若待测样品为液体物质,则直接取40-60 μ L待测样品检测,若待测样品为非液体物质,则取待测样品90-110mg磨碎,加入0.5-1.5mL样品处理液混匀,冰上静置25-35min后取上清40-60 μ L检测;

所述样品处理液为:1M Tris,pH 7.5 500 μ L,1M NaCl1.5mL,0.5M EDTA 20 μ L,50%甘油2mL,10%SDS 1mL,用双蒸水配成10mL,使用时添加1片蛋白酶抑制剂以及50 μ L的1mM苯甲基磺酰氟;

2) 检测:将待测样品滴入加样孔内,室温下作用5-10min,观察结果;

3) 检测结果分析:

阳性:质控线、检测线均呈现条带,说明待测样本中有Bar蛋白存在;

阴性:检测线不出现条带,质控线呈现条带,说明待测样本中没有Bar蛋白存在;

失效:如果检测线、质控线均不出现条带或仅有检测线出现条带,说明试纸条失效。

一种抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,具体涉及一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar胶体金免疫层析速测卡。

背景技术

[0002] 转有抗除草剂基因作物的种植,使在田间喷洒除草剂成为有效防除杂草方式,也因而使抗除草剂性状成为农业生产中最具优势的性状之一。目前,抗除草剂作物占全球转基因作物的80%以上。从发展趋势上看,转基因的作物比例仍在不断增加。

[0003] 链霉菌(streptomyces)中Bar基因表达的蛋白在乙酰辅酶A存在的情况下能催化乙酰辅酶A与除草剂草铵膦的游离氨基结合,使L-草铵膦变为乙酰-L-草铵膦,从而使除草剂失活,赋予转基因作物抗除草剂特性。Bar基因作为遗传转化中的标记基因广泛应用于基因工程育种中。

[0004] 随着转基因作物的飞速发展带来巨大经济利益的同时,人们也越来越关注转基因作物可能带来的不可预期的食用安全及环境安全性问题。因此建立合适的方法对转基因食品中转基因成分进行鉴定与检测,能够促进农业转基因生物的安全管理,保障人、动物以及微生物的安全,能够保护生态环境。为了对转基因水稻或者其衍生物中Bar蛋白进行快速的定量或定性分析,研究并得到抗除草剂Bar蛋白的单克隆抗体具有非常大的意义。

[0005] 免疫胶体金技术(Immune colloidal gold technique)是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。胶体金是由氯金酸(HAuCl₄)在还原剂如抗坏血酸、柠檬酸钠等作用下,聚合成为特定大小的金颗粒,并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态,称为胶体金。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合,由于这种结合是静电结合,所以不影响蛋白质的生物特性。胶体金标记技术是免疫层析快速诊断的核心技术,它以胶体金作为示踪标记物应用于抗原抗体反应,其实质是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。根据胶体金的一些物理性状,如高电子密度、颗粒大小、形状及颜色反应,加上结合物的免疫和生物学特性,因而使胶体金广泛地应用于免疫学、组织学、病理学和细胞生物学等领域。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡及其使用方法,从而适用于转基因水稻及其产品中抗除草剂蛋白Bar的现场快速检测以及安全性评价。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了一种胶体金免疫层析速测卡,包括卡壳和卡壳内的试纸条,所述试纸条包括底板以及粘着在底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜和吸水垫,所述金标垫包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体-胶体金结合物。

[0008] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体由保藏号为CGMCC No.17083的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6分泌得到。

[0009] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,反应膜上设有包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体的检测线和包被羊抗鼠IgG的质控线。

[0010] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,所述反应膜上设有的包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体由保藏号为CGMCC No.17084的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2分泌得到。

[0011] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,检测线和质控线间隔 0.5-1.0cm。

[0012] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,所述卡壳上设有加样孔和观察窗,所述加样孔设于样品垫上方,所述观察窗设于反应膜上方。

[0013] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,所述样品垫与金标垫、金标垫与反应膜、反应膜与吸水垫之间设有1-2mm的重叠区。

[0014] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,所述底板为PVC(聚氯乙烯)板,所述反应膜为硝酸纤维素膜。

[0015] 上述胶体金免疫层析速测卡在另一种实施方式中,所述样品垫由玻璃纤维膜或滤纸制成,所述吸水垫由滤纸制成。

[0016] 本发明还提供了上述胶体金免疫层析速测卡的检测方法,包括以下步骤:

[0017] 1) 待测样品前处理:若待测样品为植物组织提取液等液体物质,可直接取 40-60 μ L待测样品检测,若待测样品为植物叶片、茎干、种子等非液体物质,则取待测样品90-110mg磨碎,加入0.5-1.5mL样品处理液充分混匀,冰上静置 25-35min后取上清40-60 μ L检测。所述样品处理液的配方如表1所示:

[0018] 表1样品处理液配方

[0019]	成分	用量
	1M Tris, pH 7.5	500 μ L
	1M NaCl	1.5 mL
	0.5M EDTA	20 μ L
	50%glycerol	2 mL
[0020]	10% SDS	1 mL
	双蒸水 (DDH ₂ O)	配成 10mL
	蛋白酶抑制剂 (Roche)	用时添加一片
	1mM PMSF (苯甲基磺酰氟, Sigma)	用时添加 50 μ L

- [0021] 2) 检测:将待测样品滴入加样孔内,室温下作用5-10min,观察结果;
- [0022] 3) 检测结果分析:
- [0023] 阳性:质控线、检测线均呈现条带,说明待测样本中有Bar蛋白存在;
- [0024] 阴性:检测线不出现条带,质控线呈现条带,说明待测样本中没有Bar蛋白存在;
- [0025] 失效:如果检测线、质控线均不出现条带或仅有检测线出现条带,说明试纸条失效。
- [0026] 本发明所涉及的Bar单抗杂交瘤细胞株(PA1-18030030/1B8 3D6)和Bar 单抗杂交瘤细胞株(PA1-18030030/6F5 1D2),已依次于2018年12月21日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。邮编:100101,保藏编号依次为CGMCC No.17083和 CGMCC No.17084。
- [0027] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:本申请的一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar胶体金免疫层析速测卡特异性强,灵敏度高,操作简便、快速、准确,适用于转基因水稻及其产品中抗除草剂蛋白Bar的现场快速检测以及安全性评价。

附图说明

- [0028] 图1为本发明的胶体金免疫层析速测卡的卡壳及卡壳内试纸条结构示意图。
- [0029] 图2为本发明的胶体金免疫层析速测卡的检测结果示意图;阳性,质控线(即 C线)显色,检测线(即T线)肉眼可见,无论颜色深浅均判为阳性;阴性,C 线显色,T线不显色,判为阴性;无效,C线不显色,T线无论是否显色均为无效。
- [0030] 图3为本发明的胶体金免疫层析速测卡在室温下检测转基因水稻阳性叶片样品的结果图。

具体实施方式

- [0031] 下面结合附图,对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。
- [0032] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0033] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径可购得。
- [0034] 实施例1胶体金免疫层析速测卡检测转基因水稻叶片
- [0035] 使用本发明的胶体金免疫层析速测卡,卡壳及卡壳内试纸条结构示意图如图1所示。该胶体金免疫层析速测卡的检测结果会出现三种情况,如图2所示:阳性,质控线(即C线)显色,检测线(即T线)肉眼可见,无论颜色深浅均判为阳性;阴性,C线显色,T线不显色,判为阴性;无效,C线不显色,T线无论是否显色均为无效。
- [0036] 取转基因水稻叶片100mg,经液氮研磨,与样本提取液充分混匀,冰上静止30min后取上清50μL检测。室温下5min观察检测结果。具体结果详见图3,通过图3可知,原液中所含的Bar蛋白能被本申请所涉及的胶体金免疫层析速测卡特异检测到。
- [0037] 实施例2胶体金免疫层析速测卡的检验
- [0038] 1.准备工作:(取样量不低于20份,用于检验;复检、留样及其他特殊情况可另行抽取)
- [0039] 1) 对该检验项目所涉及的仪器或相关设备进行检查、调整、必要时进行核准。

[0040] 2) 核对检验成品名称、批号、批量等信息是否与指令一致;

[0041] 2. 外观: 试剂(盒)各组分是否齐全、是否完整、液体有无惨漏; 标签是否清晰易识别。

[0042] 3. 膜条宽度: 使用游标卡尺(精度为0.02mm)随机检测2条试纸, 计算2次测定结果的平均值, 结果应符合《Bar胶体金成品质量标准》要求。

[0043] 4. 液体移动速度: 按照说明书进行操作, 加入样本后开始计时, 记录样本从加样到完全流过检测窗的时间(t); 用游标卡尺测量加样窗到检测窗的上沿距离(L), 计算了L/t即为液体移动速度, 结果应符合《Bar胶体金成品质量标准》要求。

[0044] 5. 净含量: 取试剂盒中样本稀释液组分, 使用通用量具测量, 检测结果应符合《Bar胶体金成品质量标准》要求。

[0045] 6. 性能: 检测企业参考品, 应符合以下标准:

[0046] 1) 最低检出限: 重复测试最低检出限参考品10次, 计算结果。结果应符合《Bar胶体金成品质量标准》要求;

[0047] 计算方法:
$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

[0048] $LLD = \bar{x} + 3 \times S$

[0049] 式中: X——系列测定值;

[0050] $\bar{x}$ ——测定均值;

[0051] n——测定次数;

[0052] S——标准差;

[0053] LLD——最低检出限

[0054] 2) 准确度: 用不少于40个在测定范围内的不同浓度样本, 以制造商指定的分析系统作为比对方法, 每份样品按待测试剂(盒)操作方法以及比对方法分别进行测定。

[0055] 计算方法:
$$\text{Bias}(\%) = \frac{\bar{X} - X}{X} \times 100$$

[0056] 式中: Bias——相对偏差;

[0057] $\bar{X}$ ——测定均值;

[0058] X——校准品、标准品或参考物质定值。

[0059] 3) 重复性: 检测重复性参考品CV1和CV2, 每份重复检测不低于10次, 分别计算每个水平变异系数(CV), 结果应符合《Bar胶体金成品质量标准》要求:

[0060] 计算方法:
$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

[0061] $CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$

[0062] 式中: X——系列测定值;

[0063] $\bar{X}$ ——测定均值;

[0064] n——测定次数;

[0065] S——标准差;

[0066] CV——批内变异系数。

[0067] 通过上述检验,本申请所得到的胶体金免疫层析速测卡检测限:5ppb (ng/mL)。

[0068] 以上公开的仅为本发明的具体实施例,但是,本发明并非局限于此,任何本领域的技术人员能思之的变化都应落入本发明的保护范围。

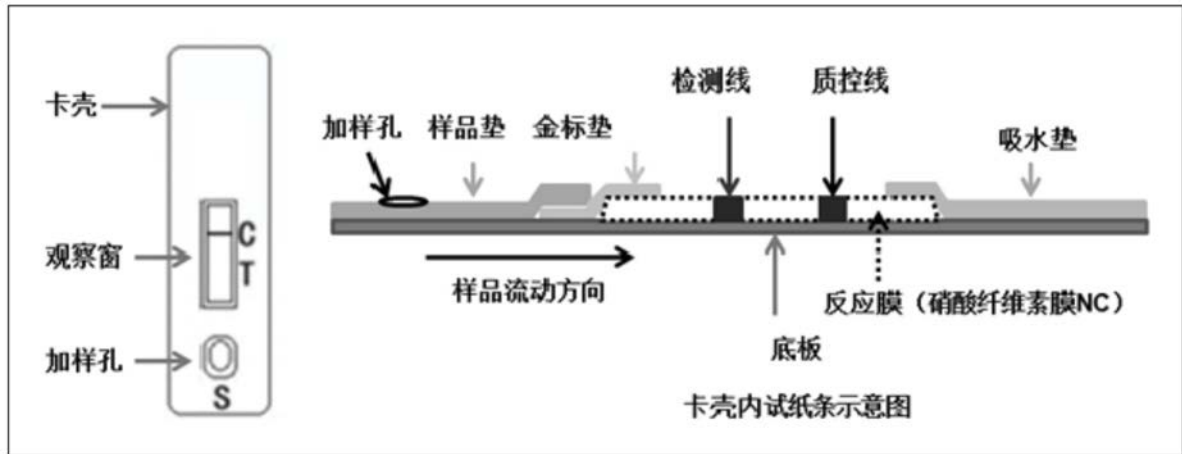


图1

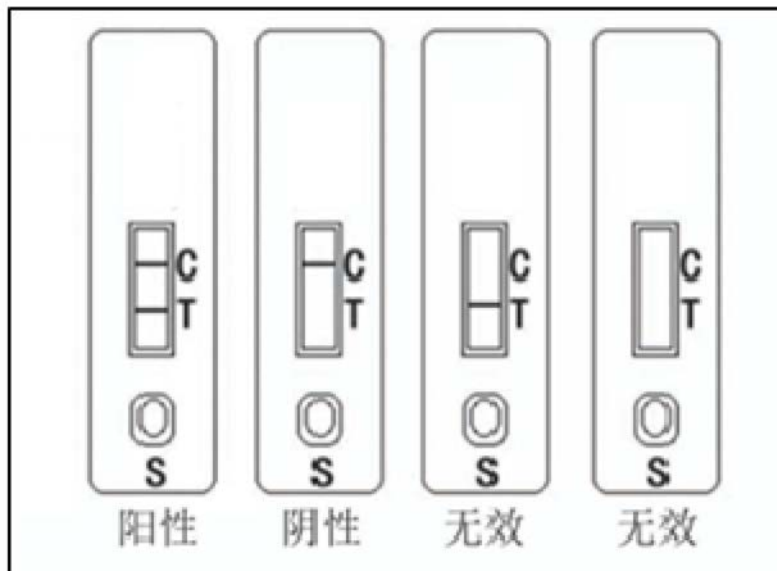


图2

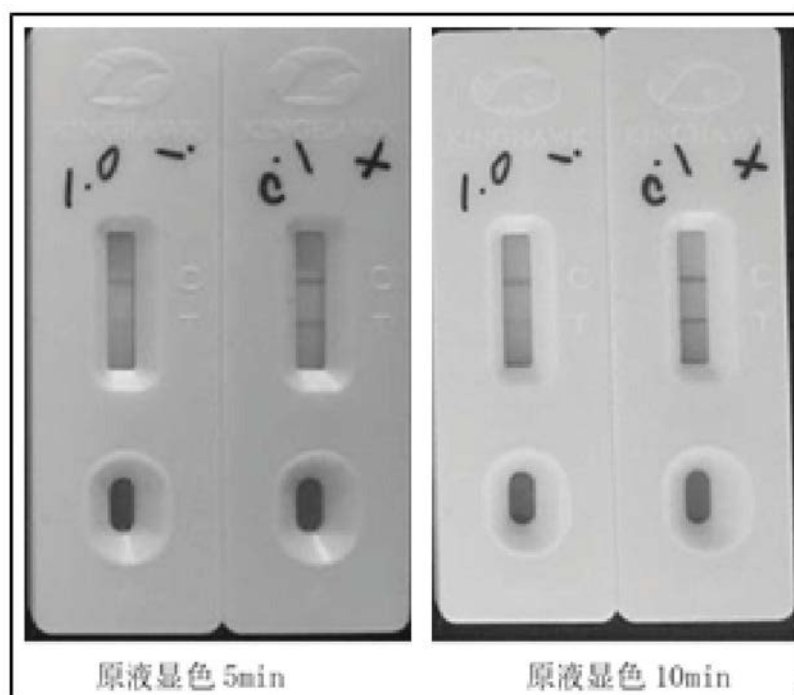


图3

专利名称(译)	一种抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡		
公开(公告)号	CN110133292A	公开(公告)日	2019-08-16
申请号	CN201910482631.4	申请日	2019-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
[标]发明人	张哲 刘卫晓 金芑军 董美 高进 黄卫红 王迪		
发明人	张哲 刘卫晓 金芑军 董美 高进 黄卫红 王迪		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了属于生物工程技术领域的一种用于转基因水稻抗除草剂蛋白Bar的胶体金免疫层析速测卡及其使用方法，所述胶体金免疫层析速测卡包括卡壳和卡壳内的试纸条，所述试纸条包括底板以及粘着在底板上依次相连的样品垫、金标垫、反应膜和吸水垫，所述金标垫包被抗除草剂蛋白Bar单克隆抗体-胶体金结合物。该速测卡特异性强，灵敏度高，并且，操作简便、快速、准确，适用于转基因水稻及其产品中抗除草剂蛋白Bar的现场快速检测以及安全性评价。

