



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103197075 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201210013557. X

(22) 申请日 2012. 01. 16

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :C201214 2012. 01. 06

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 刘军安 韩宇 华红霞 邹铅
高美虹 陈长水

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

利用量子点检测转基因水稻中 Bt 蛋白的方法

(57) 摘要

本发明属于转基因成分的检测技术领域,具体涉及一种利用量子点检测转基因水稻中转 Bt 蛋白的快速简便检测方法。该方法包括:以抗 Cry1Ab 单克隆抗体为一抗,量子点 (QDs) 标记羊抗兔 IgG 为二抗,制备得到 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心,建立了检测水稻 Bt 蛋白的双抗夹心荧光免疫吸附测定法,该方法对 Cry1Ab 标准蛋白的浓度最低可检值为 9pg/mL,线性检测范围为 6 ~ 200pg/mL,回收率在 91. 6 ~ 105. 9,变异系数在 3. 0 ~ 12. 6。本发明的量子点双抗夹心荧光免疫吸附测定法适合转基因水稻的定量检测,其特点是快速、简单和高灵敏度高。

1. 一种检测转基因水稻中 Cry1Ab 蛋白的快速简便方法,其特在于如下步骤:

(1) 抗 Cry1Ab 单克隆抗体的制备

以 Cry1Ab 蛋白为抗原获得兔血清,通过纯化得到抗 Cry1Ab 单克隆抗体作为一抗,分泌该单克隆抗体的抗 Cry1Ab 单克隆抗体杂交瘤细胞 HHX-001 保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),其保藏号为 CTCC NO :C201214。

(2) CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体 (即二抗) 的制备

1) 将 500 μ L 羊抗兔 IgG 抗体溶液分装成 10 等份的 50 μ L 小管子,保存于 -20℃ 冰箱内,待用时取出一小管,置于 4℃ 冰箱处,备用;

2) 取 25 μ L CdSe/ZnS 量子点母液,20 μ L 1- 乙基 - (3- 二甲基氨基丙基) 端二亚胺盐酸盐溶液和 10 μ L N- 羟基琥珀酰亚胺溶液, pH7. 0, 混合反应 5min, 再加入 0. 2mg 羊抗兔 IgG 抗体溶液, 加无菌水配成 100 μ L 的标记物溶液, 在常温下反应 2-4h; 将上述标记物溶液置磁力搅拌器中混匀, 反应结束后置于 4℃ 冰箱内过夜, 得到 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体粗品;

3) 将 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体粗品 100 μ L 用加样枪放入含有超滤膜的样品储存管中, 在另一个管子中放入等量的水作为平衡, 在转速为 10, 000rpm, 离心时间为 20min, 离心温度为 4℃ 的离心机中离心;

4) 在步骤 3) 离心结束后, 加入 PBS 缓冲液, 按步骤 3) 的条件重复离心一次;

5) 在步骤 4) 离心结束后, 向样品储存管中加入 100 μ L PBS 缓冲液, 然后将其倒扣在离心管上, 在转速为 500rpm, 时间为 3min, 温度为 4℃ 的离心机中离心并回收样品, 即为二抗;

(3) CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心的制备

以抗 Cry1Ab 单克隆抗体为一抗, 将该一抗与包被缓冲液按体积比 1 : 1000 稀释, 然后加入到酶标板孔中, 20℃ 孵育过夜, 次日用 PBS 缓冲液洗板 3 次, 每次 5min, 拍干后加封闭缓冲液, 每孔 200 μ L, 于 37℃ 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5min; 将 Cry1Ab 蛋白溶液用 PBS 缓冲液稀释至 6. 0pg/ml、12. 5pg/ml、25. 0pg/ml、50. 0pg/ml、100. 0pg/ml、200. 0pg/ml 梯度浓度后加于包被孔中, 每孔 100 μ L, 于 37℃ 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5min; 将纯化后的二抗用 PBS 缓冲液稀释至 10. 00ug/mL, 加入酶标板的包被孔内。每孔 100 μ L, 于 37℃ 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液快速洗涤, 得到 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心;

(4) 绘制 Cry1Ab 蛋白的标准曲线

将 0. 4 μ g/ml 的 Cry1Ab 蛋白标准溶液稀释为 200pg/mL、100, pg/mL、50, pg/mL、25pg/mL、12. 5pg/mL 和 6pg/mL 梯度浓度, 用 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心检测水稻 Cry1Ab 蛋白的含量, 以该梯度浓度稀释的 Cry1Ab 蛋白溶液浓度为自变量, 以对应的 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度值减去空白对照相对荧光强度值为应变变量, 绘制标准曲线, 公式如下:

$$Y = 0. 0137X + 0. 02 \quad R^2 = 0. 994,$$

X 为系列梯度稀释的 Cry1Ab 蛋白溶液浓度为自变量,

Y 为对应 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度;

(5) 用酶标仪检测 OD₄₅₀ 的值, 判定待检测水稻中 Cry1Ab 蛋白的含量;

其中:

所述的 CdSe/ZnS 量子点母液的组分及配制：

称取 0.0127g, 0.1mmol 的 CdO 和 0.11g 的硬脂酸放入 50mL 的三颈瓶中, 在氩气保护下, 加热至 130℃, 使 CdO 充分溶解于硬脂酸中; 将温度降至室温后, 称取三辛基氧化磷和十六烷基胺各 1.5g 放入三颈瓶中, 搅拌加热到 230℃, 另称取 0.032g, 1mmol 的硫粉, 在氩气保护下, 使之溶解于 2mL 三辛基磷中, 抽入 5mL 的针管中作为储备液; 当 Cd 前驱物温度达到 230℃时, 将 Se 粉储备液快速注入三颈瓶后, 使温度降至 180℃, 保持 10min, 收集 CdSe 样品溶于氯仿中备用;

称取 0.632g 的硬脂酸锌和 0.032g 的硫粉分别加入 2mL 的十八碳烯中加热至 120℃充分溶解, 分别得到硬脂酸锌溶液和硫粉溶液, 降温至 70℃, 将硬脂酸锌溶液和硫粉溶液混合后于 70℃下保存备用; 将分散于氯仿中的 CdSe 样品加入瓶中, 加热至 120℃保持 30min, 蒸干氯仿, 升温至 200℃; 抽取硬脂酸锌和硫粉的十八碳烯溶液, 以 0.2mL/min 注入 ZnS 壳层, 注入完成后, 升温至 230℃保持 1h, 降温至 60℃, 反应产物用甲醇沉化, 离心清洗三次, 得到 CdSe/ZnS 氯仿溶液; 取 CdSe/ZnS 氯仿溶液、巯基丙酸和去离子水各 1mL 放入瓶中混合, 强烈搅拌 3h, 抽取上层水溶液, 加甲醇离心清洗三次, 后分散于 1mL 去离子水中即获得 CdSe/ZnS 量子点母液;

其中：

PBS 缓冲液组分及配制：

KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na_2HPO_4 2.9g, Tween-20 0.5mL, 加蒸馏水定容至 1L, 调 pH 至 7.4;

包被缓冲液组分及配制：

Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水定容至 1L;

封闭缓冲液组分及配制：

将牛血清白蛋白 0.1g 溶于 100mL PBS 缓冲液中。

2. 一种分泌 Cry1Ab 蛋白的单克隆抗体的抗 Cry1Ab 单克隆抗体杂交瘤细胞 HHX-001, 保藏在中国典型培养物保藏中心, 其保藏号为 CCTCC NO :C201214。

3. 权利要求 2 所述的杂交瘤细胞 HHX-001 分泌的单克隆抗体在检测转 Bt 基因水稻中的应用。

利用量子点检测转基因水稻中 Bt 蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明属于作物转基因成分的检测技术领域,具体涉及利用量子点检测转基因水稻中 Bt 蛋白的方法,本发明与 ELISA 方法相关。

背景技术

[0002] 转基因生物的安全评价是转基因生物及其产品市场化和商品化的前提,在安全评价中转基因成分的检测是一项重要内容,建立转基因生物快速、简便、准确的检测方法为安全评价和管理奠定基础。

[0003] 我国对转基因水稻的研究处于世界领先水平,其中,研发的一些抗病、抗虫转基因水稻品系已经申请生产种植用生物安全证书,但由于它们的转基因生物安全问题等一些原因,至今尚未有品系批准商业化生产应用。鉴于转基因水稻技术的成熟以及其产品市场化的趋势,因此建立一种快速、简便的检测 Bt 蛋白的方法,具有必要性和紧迫性。

[0004] 目前对于转基因成分的检测可从外源基因的核酸和蛋白质两个水平进行。核酸水平的检测,主要针对转入的外源基因的核苷酸序列并根据外源基因与内源基因的同源性设计检测方法,主要采用的方法是 PCR 扩增,即依据转入外源基因的启动子、目的基因、终止子及表达(重组)载体信息,设计特异性引物,进行聚合酶链式反应,依据产物的有无或多少判断是否为转基因产品。PCR 反应具有高灵敏度、高特异性、高效性的特点,是转基因产品初筛阶段的主要检测方法。

[0005] 蛋白水平的检测,主要是基于抗原和抗体相互作用的免疫学方法,针对转基因植物及其产品中外源目的基因表达的特异性蛋白进行定性和定量检测。1971 年瑞典的 Engvall 等人分别以纤维素和聚丙烯酰胺试管作为固相载体吸附抗原/抗体,建立了酶联免疫吸附法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay,简称 ELISA 方法)。1974 年 Voller 等人改用聚苯乙烯微量反应板作为固相免疫吸附载体,使 ELISA 方法得以推广应用,使得用于抗原定位的酶标记抗体技术发展成液体标本中微量物质的测定方法,并逐渐成为抗原抗体检测中最为常用的一种方法。它将酶标记物同抗原抗体复合物的免疫反应与酶的催化放大作用相结合,既保持了酶催化反应的敏感性,又保持了抗原抗体反应的特异性,因而极大的提高了灵敏度。同时它又是一种非均相免疫分析方法,即在反应的每一步都有洗涤过程,从而除去了未反应物和干扰物质。由于 ELISA 方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测迅速和非放射性以及可以批量测定等诸多优点,使得 ELISA 方法得到了越来越广泛的应用。

[0006] 但是随着检测灵敏度的要求越来越高,具有独特荧光特性的量子点越来越受到人们的关注。

[0007] 量子点(quantumdots)是一种由 II 族~VI 族或 III 族~V 族元素组成的、稳定的、溶于水的、介于 1nm~100nm 的、能够接受激发光产生荧光的半导体纳米晶粒。当它的物理尺寸小于激子的玻尔半径时,由于量子限制效应,使其具有独特的光学和电子学性质。它的光学性质主要取决于它的半径的大小,而与它的组成无关,通过改变量子点的大小就

可以获得从紫外到近红外范围内任意点的光谱。

[0008] 由于具有独特的荧光特性,量子点与传统的有机荧光染料相比具有以下优点:

[0009] (1) 具有宽的激发波长范围和窄的发射波长范围,即可以使用小于其发射波长 10nm 的任意波长的激发光进行激发,这样就可以使用同一种激发光同时激发多种量子点,发射出不同波长的荧光,因而可用于多种标记物的同时检测。

[0010] (2) 量子点的发射峰窄而对称,且连续分布,重叠小,这样,在一个可检测到的光谱范围内可同时使用多个探针,而发射光谱不出现交叠,使生物分子的多组分分析检测变得容易。而传统的有机荧光染料的发射峰不仅宽,而且不对称,拖尾严重,互相重叠严重,容易互相干扰,给分析检测带来难以解决的难题。

[0011] (3) 量子点的发射波长可通过控制它的大小和组成来调谐,可以任意合成所需波长的量子点,大小均匀的量子点谱峰为对称高斯分布,而传统的有机荧光染料的峰形则为对数正态分布。

[0012] (4) 量子点的荧光强度比最常用的有机荧光染料罗丹明 6G 染料高 20 倍,它的稳定性更是罗丹明 6G 染料的 100 倍以上,而且量子点抗光漂白能力强。

[0013] (5) 生物相容性好,尤其是经过各种化学修饰之后,可以进行特异性连接,细胞毒性低,对生物体危害小,可进行生物活体标记和检测,而传统的有机荧光染料一般毒性较大,生物相容性差。

[0014] (6) 荧光寿命长,典型的有机荧光染料的荧光寿命仅为几纳秒 (ns),这与很多生物样本的自发荧光衰减的时间相当。而量子点的荧光寿命可持续长达数十纳秒 (20ns ~ 50ns),这使得当光激发数纳秒以后,大多数的自发荧光背景已经衰减,而量子点荧光仍然存在,此时即可获得无背景干扰的荧光信号。

[0015] 这些独特的光学特性,使量子点成为了一种理想的荧光探针。因此,使用量子点代替有机荧光染料,将在分子标记、信号传导、细胞内分子的运动和迁移等研究中发挥重要的作用。利用量子点标记抗体已经成功的用于对鸡肉中的磺胺二甲嘧啶残留进行了荧光免疫检测。因此,利用量子点作为生物荧光探针,在免疫生物学和食品检测等研究中有广阔的应用前景。

发明内容

[0016] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一种适用于转基因水稻中 Bt 的高灵敏度快速检测方法。本发明的方法基于量子点双抗夹心荧光免疫吸附测定法原理,建立定量检测转基因水稻中 Bt 蛋白含量的检测方法,本发明能准确快速、简单、高灵敏度检测出转基因水稻 中 Bt 蛋白含量,不需要特殊设备,为基层检测人员提供一种快速简便的方法,本发明的方法同时也为转基因生物及其产品安全评价和管理提供借鉴。

[0017] 本发明的技术方案如下:

[0018] 一种利用量子点检测转基因水稻中 Bt 蛋白的快速简便方法,其步骤如下:

[0019] (1) 抗 Cry1Ab 单克隆抗体的制备

[0020] 以 Cry1Ab 蛋白为抗原获得兔血清,通过纯化得到抗 Cry1Ab 单克隆抗体作为一抗,分泌该单克隆抗体的抗 Cry1Ab 单克隆抗体杂交瘤细胞

[0021] HHX-001 保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),其保藏号为 CTCC NO:

C201214。

[0022] (2) CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体即二抗的制备

[0023] 1) 将 500 μ L 羊抗兔 IgG 抗体溶液分装成 10 等份的 50 μ L 小管子, 保存于 -20°C 冰箱内, 待用时取出一小管, 置于 4°C 冰箱处, 备用;

[0024] 2) 取 25 μ L CdSe/ZnS 量子点母液, 20 μ L 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 端二亚胺盐酸盐 (EDC) 溶液和 10 μ L N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液, pH7.0, 混合反应 5min, 再加入 0.2mg 羊抗兔 IgG 抗体溶液, 加无菌水配成 100 μ L 的标记物溶液, 在常温下反应 2-4h; 将上述标记物溶液置磁力搅拌器中混匀, 反应结束后置于 4°C 冰箱内过夜, 得到 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体粗品;

[0025] 3) 将 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗兔 IgG 抗体粗品 100 μ L 用加样枪放入含有超滤膜的样品储存管中, 在另一个管子中放入等量的水作为平衡, 在转速为 10,000rpm, 离心时间为 20min, 离心温度为 4°C 的离心机中离心;

[0026] 4) 在步骤 3) 的离心结束后, 加入 PBS 缓冲液, 按步骤 3) 的条件重复离心一次;

[0027] 5) 在步骤 4) 离心结束后, 向样品储存管中加入 100 μ L PBS 缓冲液, 然后将其倒扣在离心管上, 在转速为 500rpm, 时间为 3min, 温度为 4°C 的离心机中离心并回收样品, 即为二抗;

[0028] (3) CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心的制备

[0029] 以抗 Cry1Ab 单克隆抗体为一抗, 将该一抗与包被缓冲液按体积比 1 : 1000 稀释, 然后加入到酶标板孔中, 20°C 孵育过夜, 次日用 PBS 缓冲液洗板 3 次, 每次 5min, 拍干后加封闭缓冲液, 每孔 200 μ L, 于 37°C 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5min; 将 Cry1Ab 蛋白溶液用 PBS 缓冲液稀释至 6.0pg/ml、12.5pg/ml、25.0pg/ml、50.0pg/ml、100.0pg/ml、200.0pg/ml 梯度浓度后加于包被孔中, 每孔 100 μ L, 于 37°C 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5min; 将纯化后的二抗用 PBS 缓冲液稀释至 10.00ug/mL, 加入酶标板的包被孔内。每孔 100 μ L, 于 37°C 下静置 1h, 之后用 PBS 缓冲液快速洗涤, 得到 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心;

[0030] (4) 绘制 Cry1Ab 蛋白的标准曲线

[0031] 将 0.4 μ g/ml 的 Cry1Ab 蛋白标准溶液稀释为 200pg/mL、100, pg/mL、50, pg/mL、25pg/mL、12.5pg/mL 和 6pg/mL 梯度浓度, 用 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心检测水稻 Cry1Ab 蛋白的含量, 以该梯度浓度稀释的 Cry1Ab 蛋白溶液浓度为自变量, 以对应的 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度值减去空白对照相对荧光强度值为应变量, 绘制标准曲线, 公式如下:

[0032] $Y = 0.0137X + 0.02$ $R^2 = 0.994$,

[0033] X 为系列梯度稀释的 Cry1Ab 蛋白溶液浓度为自变量,

[0034] Y 为对应 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度;

[0035] (5) 用酶标仪检测 OD450 的值, 判定待检测水稻中 Cry1Ab 蛋白的含量;

[0036] 其中:

[0037] CdSe/ZnS 量子点母液的组分及配制:

[0038] 称取 0.0127g (0.1mmol) CdO 和 0.1140g 硬脂酸放入 50mL 的三颈瓶中, 在氩气保护下, 加热至 130°C , 使 CdO 充分溶解于硬脂酸中; 将温度降至室温后, 称取三辛基

氧化磷 (TOP0) 和十六烷基胺 (HDA) 各 1.5g 放入三颈瓶中, 搅拌加热到 230℃, 另称取 0.032g (1mmol) 硫粉, 在氩气保护下, 使之溶解于 2mL 三辛基磷 (TOP) 中, 抽入 5mL 的针管中作为储备液; 当 Cd 前驱物温度达到 230℃ 时, 将 Se 粉储备液快速注入三颈瓶后, 使温度降至 180℃, 保持 10min, 收集 CdSe 样品溶于氯仿中备用;

[0039] 称取 0.632g 的硬脂酸锌和 0.032g 的硫粉分别加入 2mL 的十八碳烯 (ODE) 中加热至 120℃ 充分溶解, 分别得到硬脂酸锌溶液和硫粉溶液, 降温至 70℃, 将硬脂酸锌溶液和硫粉溶液混合后于 70℃ 下保存备用; 将分散于氯仿中的 CdSe 样品加入瓶中, 加热至 120℃ 保持 30min, 蒸干氯仿, 升温至 200℃; 抽取硬脂酸锌和硫粉的十八碳烯溶液, 以 0.2mL/min 注入 ZnS 壳层, 注入完成后, 升温至 230℃ 保持 1h, 降温至 60℃, 反应产物用甲醇沉化, 离心清洗三次, 得到 CdSe/ZnS 氯仿溶液; 取 CdSe/ZnS 氯仿溶液、巯基丙酸和去离子水各 1mL 放入瓶中混合, 强烈搅拌 3h, (量子点即由最初的氯仿溶液中转移进入水溶液中, 这是一种化学现象, 不可以写在权利要求书中, 只能写在说明书中, 带有推理性质, 权利要求不保护自然现象现象和规律、机理等理论成果), 抽取上层水溶液, 加甲醇离心清洗三次, 后分散于去 1mL 去离子水中即获得 CdSe/ZnS 量子点母液;

[0040] PBS 缓冲液组分及配制:

[0041] KH₂PO₄ 0.2g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 2.9g, Tween-20 0.5mL, 加蒸馏水定容至 1L, 调 pH 至 7.4;

[0042] 包被缓冲液的组分及配制:

[0043] Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 加蒸馏水定容至 1000mL;

[0044] 封闭缓冲液组分及配制:

[0045] 将牛血清白蛋白 0.1g 溶于 100mL PBS 缓冲液中。

[0046] 将上述分泌 Cry1Ab 蛋白的单克隆抗体的抗 Cry1Ab 单克隆抗体杂交瘤细胞 HHX-001, 于 2012 年 1 月 6 日送交中国·武汉·武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏, 其保藏号为 CCTCC NO: C201214。

[0047] 本发明建立了运用量子点标记抗体的双抗夹心荧光免疫吸附测定法定量检测转基因水稻中的 Cry1Ab 蛋白的新方法。该方法对标准蛋白的浓度最低可检值为 9pg/mL, 线性检测范围为 6 ~ 200pg/mL; 回收率在 91.6 ~ 105.9; 变异系数在 3.0 ~ 12.6。并且用该方法对转基因水稻和非转基因水稻中 Bt 蛋白进行定量检测, 结果表明量子点标记抗体的双抗夹心荧光免疫吸附测定法适合转基因水稻的定量检测。

[0048] 本发明所设计的转基因水稻中 Bt 蛋白简单实用的检测方法。与其它传统检测方法相比该发明有以下优点:

[0049] 1. 本发明经济实用: 反应是在恒温的条件下进行, 所以不需要昂贵的 PCR 仪, 而且检测周期比较短。

[0050] 2. 本发明的灵敏度高: 该方法对标准 Bt 蛋白的最低检测浓度为 9pg/mL, 比常规 ELISA 法的检测灵敏度高 800-1000 倍。

[0051] 3. 本发明检测简单: 该方法检测转基因水稻中 Bt 蛋白结果客观、易判定, 可对转基因产品的含量进行定量分析。

[0052] 更详细的技术方案见《具体实施方式》所述。

附图说明

- [0053] 图 1 :是本发明的量子点双抗夹心荧光免疫吸附测定法机理示意图。
- [0054] 图 2 :是本发明的技术流程图。
- [0055] 图 3 :是 CdTe 量子点的 TEM 电镜图像。
- [0056] 图 4 :是 CdTe 量子点标记羊抗兔 IgG 的发射光谱图像。
- [0057] 图 5 :CdTe 量子点标记羊抗兔 IgG 的电泳图
- [0058] 图 6 :量子点双抗夹心荧光免疫吸附测定法检测 Cry1Ab 蛋白的浓度标准曲线图。

具体实施方式

[0059] 下面通过实施例对本发明作进一步说明,但不是限制本发明。

[0060] 实施例 1 从苏云金芽胞杆菌基因组中分离得到 Cry1Ab 蛋白

[0061] Cry1Ab 蛋白的制备委托上海丽臣生物科技有限公司完成,具体步骤如下:将储存于 -70℃ 冰箱中的苏云金芽胞杆菌菌株 (kurstaki HD-1, 一种公开报道的菌株, 参见文献: Linda Thorne, Fermin Garduno, Ted Thompson, Debra Decker, Maryann Zounes, Martha Wild, Alan m. Walfield, And Thomas J. Pollock*, Structural Similarity between the Lepidoptera-and Diptera-Specific Insecticidal Endotoxin Genes of *Bacillus thuringiensis* subsp " kurstaki " and " israelensis " , Journal of Bacteriology, June 1986, p. 801-811), 划线到 LB 平板上 30℃ 生长过夜, 挑单菌落到 10mL 的 LB 培养基于 30℃ 振荡培养过夜。再将过夜培养的菌液加入 200mL 的 PGSM 培养基中于 30℃ 振荡培养 3-4 天后, 在显微镜下观察细胞可以看到裂解的细胞。然后 4℃, 4000rpm 离心 15min 收集培养物, 用冰冷的 0.1mol/L NaCl 洗涤沉淀一次, 4℃, 4000rpm 离心 15min 收集培养物, 再用冰冷的双蒸水洗涤沉淀一次, 在 4℃, 4000rpm 离心 15min 收集培养物, 将沉淀悬浮于 15mL 冰冷的纯水中。再将溶液于 4℃, 4000rpm 离心 15min 收集沉淀, 该沉淀即为 Cry1Ab 蛋白。将沉淀悬浮于 0.1mol/L NaOH 中 15min 使 Cry1Ab 蛋白完全溶解, 马上用 1mol/L Tris 缓冲溶液调节溶液的 pH 至 7.0, 于 12000rpm 离心 10min 后, 取上清液用 100 倍体积的 PBS 溶液透析三次。采用 Bradford 法测定其浓度;

[0062] 其中:

[0063] 所述的试剂组分及其配比如下:

[0064] LB 培养基: 胰蛋白胨 (Tryptone) 10g/L, 酵母提取物 (Yeast extract) 5g/L, 氯化钠 (NaCl) 10g/L, NaOH 调节该培养基的 pH, 使其达到 7.4;

[0065] PGSM 培养基: 细菌蛋白胨 7.5g, 葡萄糖 1g, KH₂PO₄ 3.4g, K₂HPO₄ 4.35g, 加蒸馏水定容至 1L, 调 pH 至 7.2, 121℃ 高温蒸汽下灭菌 30min;

[0066] PBS 缓冲液: KH₂PO₄ 0.2g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 2.9g, Tween-20 0.5mL, 加蒸馏水定容至 1L, 调 pH 至 7.4;

[0067] Tris 缓冲溶液: 50ml 0.1mol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液用 0.1mol/L 盐酸调节 pH 至 7.0, 加水稀释至 100ml。

[0068] 实施例 2 抗 Cry1Ab 单克隆抗体 (一抗) 的制备

[0069] (1) 抗 Cry1Ab 单克隆抗体的制备

[0070] 本实施例参照薛庆善《体外培养的原理与技术》科学出版社 2001 年版中报道的方

法进行。具体方法如下：

[0071] 采用背部多点注射的方法免疫家兔，用实施例 1 中得到的 Cry1Ab 蛋白于家兔脊柱两旁选 4-6 点皮下注射，每点注射 0.1mL，间隔两周后再于上述部位选不同点注射。每次免疫的 Cry1Ab 蛋白量约 100 μ g。免疫次数在四五次即可，抗原用量大可以减少次数。

[0072] 兔子购回饲养一周左右，进行第一次免疫，第一次免疫 2-4 周后进行第二次免疫，之后每隔 7-10 天免疫一次。免疫一周后，可于耳动脉取血既得抗 Cry1Ab 单克隆抗体粗品。

[0073] (2) 抗 Cry1Ab 单克隆抗体的纯化

[0074] 利用固定在 NC 膜上的抗原亲和纯化特异性对抗 Cry1Ab 单克隆抗体进行纯化。具体方法如下：

[0075] 1) 在 1mL 兔血清中加 0.1mL 的质量分数为 10% 十二烷基硫酸钠水溶液（即 SDS），0.01mL 的 β -巯基乙醇，于 100℃ 下水浴 5min；

[0076] 2) 加 100 μ L 10 $\times$ SDS-PAGE 缓冲液（购于上海宝曼生物科技有限公司），混匀；

[0077] 3) 灌胶，上层质量分数为 5%，下层质量分数为 8% 的 SDS-PAGE 胶；

[0078] 4) 根据胶孔大小决定蛋白上样量（一般蛋白上样量为 20 或 40 μ L），并点预染蛋白 marker；

[0079] 5) 电泳，浓缩胶（电泳仪的电压为 80V），分离胶（电泳仪的电压为 120V）；

[0080] 6) 转膜前，先切去 SDS-PAGE 胶的多余部分，将胶置于转移缓冲液（购于上海宝曼生物科技有限公司）中 15min。剪与胶等大的滤纸 8 张，NC 膜 1 张以及海绵浸于转移缓冲液中 15min。

[0081] 7) 打开膜转移夹；

[0082] ①依次放入（每层排除气泡）：两层海绵，四层滤纸，NC 膜，再放四层滤纸，两层海绵。剪去多余的 NC 膜和滤纸；

[0083] ②将转移夹合上并固定，胶对着负极，置于电泳槽中；

[0084] ③加上转移缓冲液（电泳仪的电压为 5V）转膜过夜；

[0085] 8) 用丽春红染液染色；

[0086] ①取出膜置于培养皿中，加丽春红染液染色 5-10min；

[0087] ②倒去丽春红染料，用去离子水洗两遍，直至条带显色。

[0088] 9) 抗体结合

[0089] ①剪刀剪下目的条带，置于培养皿中，加 1 $\times$ PBS 缓冲液（配方如后所述），脱色约 10min；

[0090] ②弃去 PBS 缓冲液，加质量分数为 3% 牛血清白蛋白（BSA，用 1 $\times$ PBS 缓冲液现配），置于摇床上轻摇，封闭 1h；

[0091] ③弃去 BSA，加入新鲜的质量分数为 3% 的 BSA（用 1 $\times$ PBS 缓冲液现配），再加入 0.5mL 1 中得到的抗 Cry1Ab 单克隆抗体。于 4℃ 摇 16h 或者 16℃ 摇 5h；

[0092] ④弃去牛血清白蛋白，用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗 5 次，每次 5min；

[0093] 10) 抗体回收

[0094] 将 NC 膜剪成 0.5cm² 大小的碎片，放入 EP 管中，加入 500 μ L 洗脱缓冲液（0.2mol/L 甘氨酸），静置 20min；转移至新的 EP 管中，加入 50 μ L 1mol/L 三羟甲基氨基甲烷以及 60 μ L 10 $\times$ PBS 缓冲液混匀，4℃ 保存。取 200 μ L 检测抗 Cry1Ab 单克隆抗体效价。

[0095] (3) 抗 Cry1Ab 单克隆抗体的保存

[0096] 将上述制备成功的抗 Cry1Ab 单克隆抗体与杂交瘤细胞融合(具体操作方法参考:薛庆善,《体外培养的原理与技术》科学出版社

[0097] 2001 年版中报道的方法),筛选分泌抗 Cry1Ab 单克隆抗体杂交瘤细胞

[0098] HHX-001(该杂交瘤细胞保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其保藏号为 CTCC NO :C201214)。

[0099] (4) 运用间接 ELISA 法测定抗 Cry1Ab 单克隆抗体效价

[0100] 1) 抗原包被将所制备的 Cry1Ab 蛋白用 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液(配方如后所述)以体积比 1 : 500 稀释,包被 96 孔聚苯乙烯反应板,100uL/ 孔,置 4℃过夜;次日用 PBS 质量分数为洗液洗涤 3 次,每次间隔 10min,拍干后加入质量分数为 10% BSA 的 PBS 缓冲液进行封闭,200uL/ 孔,37℃湿盒封闭 1h 后,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10min,拍干。置 4℃冰箱保存备用。

[0101] 2) 加待检抗体用 PBS 缓冲液稀释牛血清白蛋白配成含牛血清白蛋白质量分数为 0.1%牛血清白蛋白溶液(牛血清白蛋白取自免疫后的兔耳动脉血清),加入包被好的反应板中,同时设立阴性对照和空白对照,100uL/ 孔,在 37℃下作用 1h,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10min 拍干。

[0102] 3) 加酶标二抗将商购碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔 IgG(购于上海丽臣生物科技有限公司)按推荐浓度 1 : 1000(体积比)倍稀释,100uL/ 孔,于 37℃下反应 1h,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 10min 拍干。

[0103] 4) 显色于各反应孔中加入临时配制的 NPP 溶液,75uL/ 孔,于 37℃或室温下避光显色 30-60min。

[0104] 5) 终止反应于各反应孔中加入 25uL 0.5mol/L NaOH 终止反应。

[0105] 6) 结果判定在酶标仪于 OD₄₅₀ 处读数,将空白对照孔调零后,测各孔值。

[0106] 其中:

[0107] 所述的试剂组分及其配比如下:

[0108] 碳酸盐缓冲液:Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g,加蒸馏水定容至 1000mL,调 pH 9.6;

[0109] PBS 缓冲液:KH₂PO₄ 0.2g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 2.9g, Tween-20 0.5mL,加蒸馏水定容至 1L,调 pH 至 7.4;

[0110] NPP 溶液:5ml 1mmol/L MgCl₂,2.5ml 1mmol/L ZnCl₂,1.5ml 0.1mol/L 甘氨酸,用 0.1mol/L NaOH 调节 pH 至 10.4。

[0111] 实施例 3 水溶性 CdSe/ZnS 量子点的制备

[0112] 水溶性 CdSe/ZnS 量子点的制备参照文献报道的方法(Xie HY, Liang JG, Liu Y, Zhang ZL, Pang DW, He ZK, et al.Preparation and characterization of overcoated II-VI quantum dots.J Nanosci Nanotechnol 2005 ;5 :880e6),具体步骤是:称取 0.0127g(0.1mmol)CdO 和 0.1140g 硬脂酸放入 50mL 的三颈瓶中,在氩气保护下,加热至 130℃,使 CdO 充分溶解于硬脂酸中。将温度降至室温后,称取三辛基氧化磷(TOP)和十六烷基胺(HDA)各 1.5g 放入三颈瓶中,搅拌加热到 230℃,另称取 0.032g(1mmol)S 粉,在氩气保护下,使之溶解于 2mL 三辛基磷(TOP)中,抽入 5mL 的针管中作为储备液。当 Cd 前驱

物温度达到 230℃时,将 Se 粉储备液快速注入三颈瓶后,温度降至 180℃,保持 10min,收集 CdSe 样品溶于氯仿中备用。

[0113] 称取 0.632g 的硬脂酸锌和 0.032g 的硫粉分别加入 2mL 的十八碳烯 (ODE) 中加热到 120℃充分溶解,降温到 70℃,得到硬脂酸锌溶液和硫粉溶液,将上述两种溶液混合在一起于 70℃下保存备用。将分散于氯仿中的 CdSe 样品加入瓶中,加热至 120℃,保持 30min,蒸干氯仿,升温至 200℃。抽取硬脂酸锌和硫粉的十八碳烯溶液,以 0.2mL/min 的流速注入 ZnS 壳层,注射完成后,升温至 230℃,保持 1h,再降温至 60℃,反应产物用甲醇沉化,离心清洗三次,得到 CdSe/ZnS 氯仿溶液。取 CdSe/ZnS 氯仿溶液、巯基丙酸和去离子水各 1mL 放入瓶中混合,强烈搅拌 3h,量子点即由最初的氯仿溶液中转移进入水溶液中,抽取上层水溶液,加甲醇离心清洗三次,后分散于去 1mL 去离子水中既得 CdSe/ZnS 量子点母液。然后,对其进行了透射电子显微镜、荧光光谱表征(见图 3、图 4 所示)。

[0114] 实施例 4CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗免 IgG 抗体即二抗的制备

[0115] 1) 将 500 μ L 羊抗免 IgG 抗体溶液(购于上海丽臣生物科技有限公司)分装成 10 等份的 50 μ L 小管子,保存于 -20℃冰箱处,待用时取出一小管,置于 4℃冰箱处,备用;

[0116] 2) 取 25 μ L 实施例 3 得到的 CdSe/ZnS 量子点母液,20 μ L 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)端二亚胺盐酸盐溶液(EDC 溶液)和 10 μ L N-羟基琥珀酰亚胺溶液(NHS 溶液, pH7.0)混合反应 5min,再加入 0.2mg 羊抗免 IgG 抗体溶液,加无菌水配成 100 μ L 的标记物溶液,在常温下反应 2-4h;将所述的标记物溶液置磁力搅拌器中混匀,使其反应均匀,反应结束后置于 4℃冰箱内过夜,得到 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗免 IgG 抗体粗品;

[0117] 3) 将步骤 1 制备 CdSe/ZnS 量子点标记的羊抗免 IgG 抗体粗品 100 μ L 用加样枪放入含有超滤膜的样品储存管中,在另一个管子中放入等量的水作为平衡,在转速为 10,000rpm,离心时间为 20min,离心温度为 4℃的离心机中离心;

[0118] 4) 在步骤 3) 的离心结束后,加入 PBS 缓冲液,按步骤 3) 的条件重复离心一次;

[0119] 5) 在步骤 4) 离心结束后,向样品储存管中加入 100 μ L PBS 缓冲液,然后将其倒扣在离心管上,在转速为 500rpm,时间为 3min,温度为 4℃的离心机中离心并回收样品,即为二抗;

[0120] 实施例 5CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心的制备

[0121] 以 Cry1Ab 单克隆抗体为一抗,在酶标板孔中加入由包被缓冲液稀释(Cry1Ab 单克隆抗体与包被缓冲液体积比 1 : 1000)的 Cry1Ab 单克隆抗体,于 20℃孵育过夜,次日用 PBS 缓冲液洗板 3 次,每次 5min,拍干后加封闭缓冲液,每孔 200 μ L,于 37℃下静置 1h,之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 5min;将 Cry1Ab 蛋白溶液用 PBS 缓冲液稀释至 6.0pg/ml、12.5pg/ml、25.0pg/ml、50.0pg/ml、100.0pg/ml、200.0pg/ml 梯度浓度后加于包被孔中,每孔 100 μ L,于 37℃下静置 1h,之后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,每次 5min;将纯化后的二抗经 PBS 缓冲液稀释至 1.25ug/mL、2.50ug/mL、5.00ug/mL、10.00ug/mL、20.00ug/mL 分别作为二抗的工作浓度,加于包被孔内。每孔 100 μ L,于 37℃下静置 1h,之后用 PBS 缓冲液快速洗涤,得到 CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心。

[0122] 其中:

[0123] 所述的包被缓冲液的组分及配比如下:

[0124] Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g,加蒸馏水定容至 1000mL;

[0125] 所述的封闭缓冲液组分及配比如下：

[0126] 将牛血清白蛋白 0.1g 溶于 100mLPBS 缓冲液中。

[0127] 实施例 6Cry1Ab 蛋白的浓度标准曲线建立

[0128] 将 Cry1Ab 蛋白标准溶液（购于上海丽臣生物科技有限公司，0.4 μg/ml）精确稀释为 6 个梯度浓度，分别为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6pg/mL，用量子点双抗夹心法来检测水稻 Bt 蛋白，以上述梯度稀释的 Cry1Ab 蛋白标准溶液浓度为自变量，以对应的 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度值减去空白对照相对荧光强度值为应变量，绘制标准曲线，得到如图 6 所示的 Cry1Ab 蛋白的浓度标准曲线计算公式，该公式如下所示：

[0129] $Y = 0.0137X + 0.02$ $R^2 = 0.994$ 。

[0130] X 为系列梯度稀释的 Cry1Ab 蛋白溶液浓度为自变量；

[0131] Y 为对应 Cry1Ab 蛋白相对荧光强度。

[0132] 以上述 Cry1Ab 蛋白的浓度标准曲线作为判断待检测水稻中 Cry1Ab 蛋白含量的标准。

[0133] 实施例 7CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法的灵敏度验证

[0134] 确定抗原包被浓度和抗体最佳工作浓度。具体步骤是：将纯化的 Cry1Ab 蛋白质用 pH9.6 的包被缓冲液按 1：100、1：200、1：400、1：800、1：1600、1：3200（相当于每 100 μL 中 Cry1Ab 蛋白质含量分别为 2.0 μg、1.0 μg、0.5 μg、0.25 μg、0.125 μg、0.0625 μg，依次加入酶标板的各孔中（100 μL/孔），每个稀释度为两列，于 4℃ 过夜。次日用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次间隔 10min，用 10% BSA 封闭后（200 μL/孔），于 37℃ 保存 1h 后，再用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，每次 10min，拍干，再分别将免疫后的兔耳动脉血清和未免疫的兔耳动脉血清作 1：100、1：200、1：400、1：800、1：1600、1：3200、1：6400 的倍比稀释。用方阵实验进行测定。每块板中均留 4 孔，其中两孔加入未免疫的兔耳动脉血清作为阴性对照，另外两孔加入 100 μL PBST 作为空白对照。

[0135] （1）建立间接 ELISA 方法判定标准

[0136] 用酶标仪检测 OD₄₅₀ 的值。以空白对照调零，P 为各检测孔的值，N 为阴性对照的平均值，即 $P/N \geq 2.0$ ，并且 OD₄₅₀ 值接近于 1 的免疫后的兔耳动脉血清的稀释度作为最佳工作浓度。

[0137] （2）间接 ELISA 实验方阵结果

[0138] 经过方阵实验确定，从表 1 中可以看出，免疫后的兔耳动脉血清在以 0.5 μg/孔的抗原量包被酶标板，免疫后的兔耳动脉血清最佳稀释度为 1：1600 稀释时， $P = 1.015$ ， $N = 0.186$ ， $P/N = 5.46$ ，远高于 2.0，因此将该数值处的 Cry1Ab 蛋白质、免疫后的兔耳动脉血清稀释度作为间接 ELISA 筛选方法的最佳工作浓度。

[0139] 表 1 本发明的量子点 ELISA 法检测 Cry1Ab 蛋白质的精密度和准确度比较

[0140]

理论值 (pg/ml)	检测值 (pg/ml)	标准偏差 (pg/ml)	回收率 (%)	变异系数 (%)
3.0	2.8	0.3	93.3	12.5
6.0	5.6	0.4	93.3	6.4
12.5	12.4	0.4	99.2	3.2
25.0	25.9	1.1	103.6	4.3
50.0	52.1	2.3	104.2	4.7
100.0	104.8	3.3	104.8	3.2
200.0	186.1	5.9	93.1	3.6

[0141] (3) CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法精密度和准确度的验证

[0142] 在定量范围内,选取 7 个不同浓度的 Cry1Ab 蛋白标准溶液进行测定,测定值经统计学处理,变异系数值均小于 15。各浓度蛋白的检测值与理论回收率在 90 ~ 110,均值为 100(见表 2)。说明本发明制备的核心试剂具有良好的重复性和准确度,符合中华人民共和国农业部公布的《农业转基因生物安全评价管理办法》,发布日期 2004 年 7 月 1 日,实施日期:2007 年 11 月 8 日,参见:<http://wenku.baidu.com/view/52d14bd428ea81c758f57852.html>) 的要求。

[0143] 表 2 本发明的量子点 ELISA 方法检测实物样品的结果比较

[0144]

样品种类	重复次数 (n)	平均值 (相对荧光强度)	Cry1Ab 蛋白 浓度 (pg/ml)
转基因水稻 1	3	2.2	151.2
转基因水稻 2	3	2.4	178.2
非转基因水稻	3	0.1	1.5
空白对照	3	0	0

[0145] (4) CdSe/ZnS 量子点标记的抗 Cry1Ab 蛋白双抗体夹心 ELISA 检测方法定量检测实物样品

[0146] 待测实物样品蛋白的提取:将水稻籽粒用粉碎机磨碎成粉状后,从中称取 0.5g 于 5mL 试管中,加入 2mL 样品提取液,在室温下轻微震荡 4h,然后在 5000r/min 下离心 5min,吸取上清液。实测样品中的浓度结果 (pg/mL) 由浓度标准曲线 (见图 6) 换算得到。分析量子点双抗夹心法检测结果 (见表 2) 显示,从田间取得的转基因水稻样品 1 和转基因水稻样品 2 中的 Cry1Ab 蛋白浓度分别达到 151.2pg/mL 和 178.2pg/mL,远高于最低可检测值,因而可判定该检测结果为阳性。非转基因水稻的 Cry1Ab 蛋白浓度为 1~7pg/mL(可能为田间微量花粉传粉引起),低于最低可检测值,因而可判定为检测结果阴性。对照实验结果显示本发明的检测结果是可靠的,适合用于转基因水稻转 Bt 基因蛋白的定量检测。

[0147] 其中:

[0148] 所述的样品提取液的组分及配比如下:

[0149] Mtris-HCl (pH = 8) 45ml,甘油 75ml,聚乙烯吡咯烷酮 6g,补充双蒸水至 1L。

[0150] 本实施例中所述的试剂来源及其组分和其配比如下:

[0151] 试剂来源

[0152] 本发明所用的主要化学试剂的特殊试剂来自下列商购渠道（省略常用试剂的渠道）：CdO（国药集团化学试剂有限公司）；氩气（国药集团化学试剂有限公司）；Cd（国药集团化学试剂有限公司）；碳二亚胺（EDC）（国药集团化学试剂有限公司）；N- 羟基琥珀酰亚胺（NHS）（上海国药集团）；Cry1Ab 蛋白标准品（上海丽臣生物科技有限公司）；牛血清蛋白（BSA）（罗氏公司生产）；三羟甲基氨基甲烷 Tris（国药集团化学试剂有限公司）；氧化镉（CdO，含量 99.99%）、十六烷基胺（HDA，含量 90%）、三辛基氧化磷（TOPO，含量 90%）、三辛基磷（TOP，含量 90%）、硫粉（S，99%）、巯基丙酸（MPA，98%）。

[0153] 仪器来源

[0154] FA1004 型电子天平 上海良平仪器仪表有限公司

[0155] DC-2 型多功能搅拌器 河南省巩义市英峪予华仪器厂

[0156] Evolution 300 型紫外 - 可见分光光度计 Thermo Electron Corporation

[0157] LS-55 荧光分光光度计型荧光分光光度计 美国 Perkin Elmer 公司

[0158] TEM-H-70000FA 透射电子显微镜 日本日立公司

[0159] Milli-Q 超纯水机 美国 Millipore 公司。

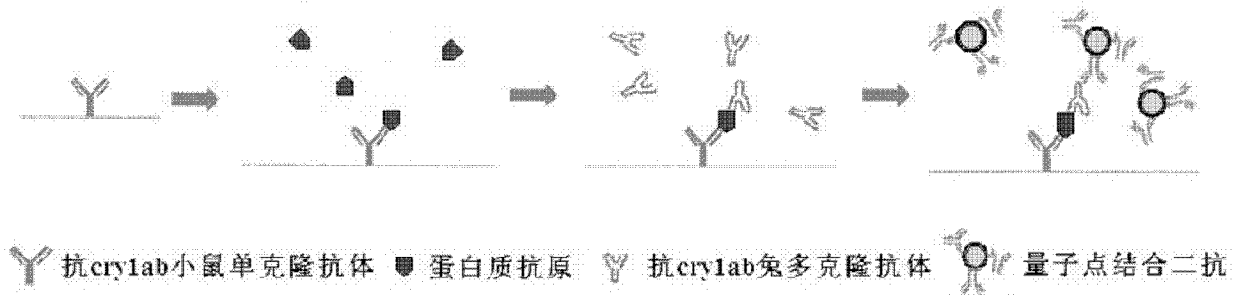


图 1

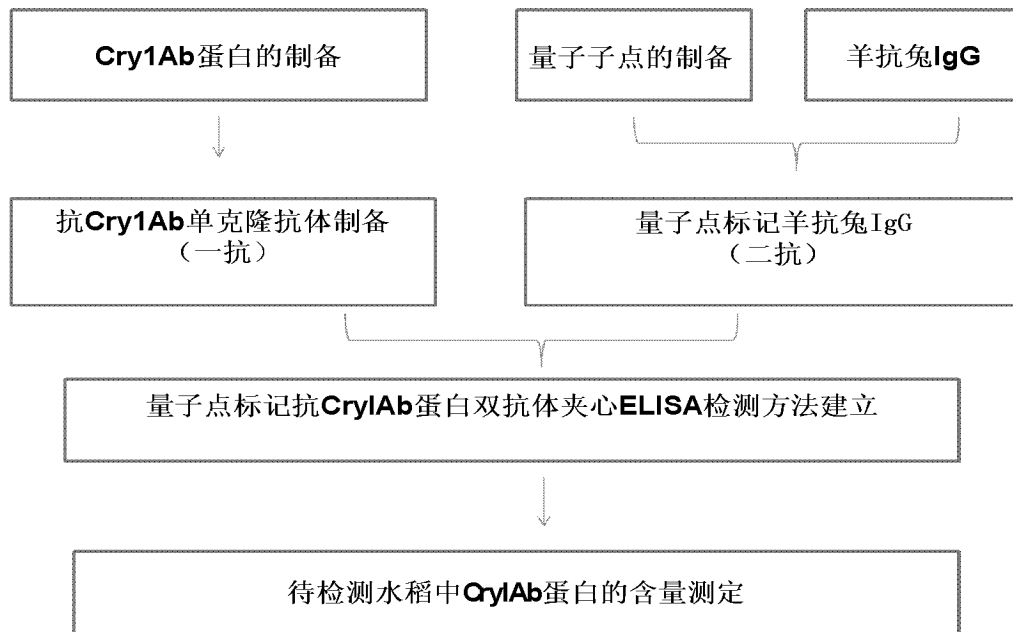


图 2

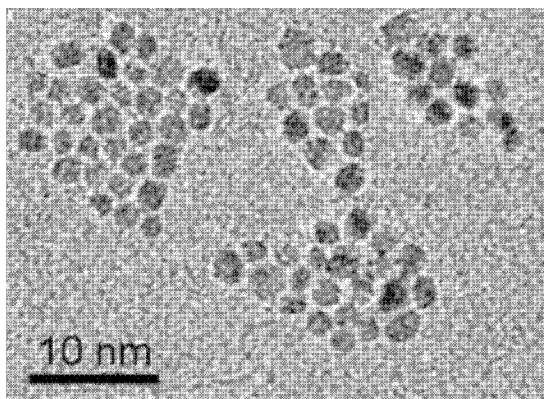


图 3

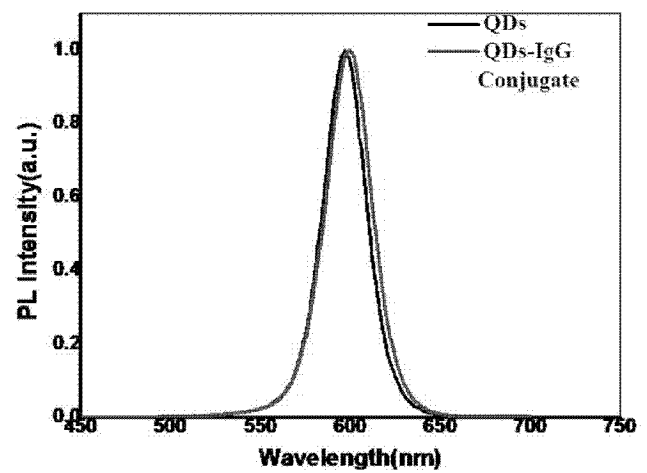


图 4

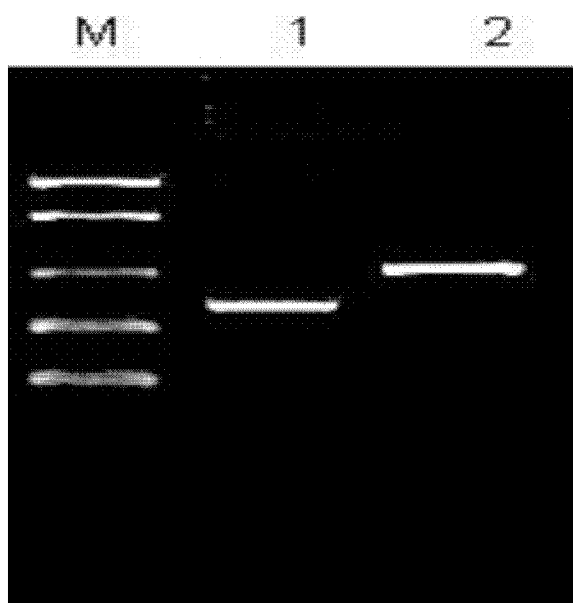


图 5

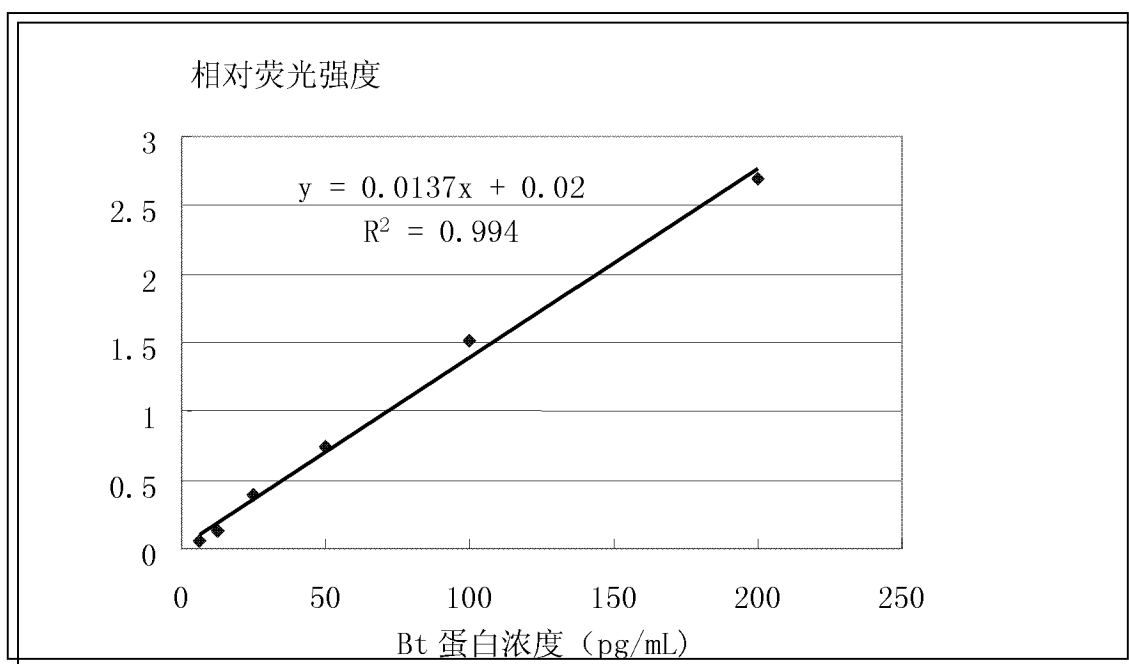


图 6

专利名称(译)	利用量子点检测转基因水稻中Bt蛋白的方法		
公开(公告)号	CN103197075A	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201210013557.X	申请日	2012-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	刘军安 韩宇 华红霞 邹铅 高美虹 陈长水		
发明人	刘军安 韩宇 华红霞 邹铅 高美虹 陈长水		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
代理人(译)	张红兵		
其他公开文献	CN103197075B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于转基因成分的检测技术领域，具体涉及一种利用量子点检测转基因水稻中转Bt蛋白的快速简便检测方法。该方法包括：以抗CryIAb单克隆抗体为一抗，量子点(QDs)标记羊抗兔IgG为二抗，制备得到CdSe/ZnS量子点标记的抗CryIAb蛋白双抗体夹心，建立了检测水稻Bt蛋白的双抗夹心荧光免疫吸附测定法，该方法对CryIAb标准蛋白的浓度最低可检值为9pg/mL，线性检测范围为6~200pg/mL，回收率在91.6~105.9，变异系数在3.0~12.6。本发明的量子点双抗夹心荧光免疫吸附测定法适合转基因水稻的定量检测，其特点是快速、简单和高灵敏度。

理论值 (pg/ml)	检测值 (pg/ml)	标准偏差 (pg/ml)	回收率 (%)	变异系数 (%)
3.0	2.8	0.3	93.3	12.5
6.0	5.6	0.4	93.3	6.4
12.5	12.4	0.4	99.2	3.2
25.0	25.9	1.1	103.6	4.3
50.0	52.1	2.3	104.2	4.7
100.0	104.8	3.3	104.8	3.2
200.0	186.1	5.9	93.1	3.6