



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866414 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610110917.6

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.02.28

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘
路866号

申请人 无锡福阳生物科技有限公司

(72)发明人 寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿
武爱波 徐伟

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

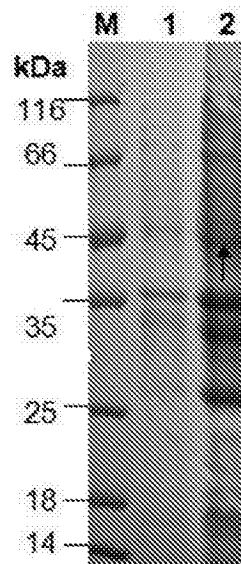
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

转基因蛋白g10-epsps的定量检测方法及所
用试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种g10-epsps定量检测试剂盒,包括如下组分:抗体预包被酶标板;样品稀释液,为磷酸盐缓冲液;洗涤液,为含Tween-20的磷酸盐缓冲液;反应终止液,为H₂SO₄溶液;V、酶标抗体,为辣根过氧化物酶标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体;VI、显色剂;VII、g10-epsps标准品。本发明还同时公开了利用试剂盒进行的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法,包括以下步骤:从待检样本中提取蛋白,得蛋白提取液;用g10-epsps定量检测试剂盒对蛋白提取液进行检测;通过用g10-epsps蛋白标准品制作的浓度-吸光度标准曲线,计算待检样品中的g10-epsps蛋白浓度。



1. g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于包括如下组分:

I、抗体预包被酶标板;

II、样品稀释液,为磷酸盐缓冲液;

III、洗涤液,为含Tween-20的磷酸盐缓冲液;

IV、反应终止液,为 H_2SO_4 溶液;

V、酶标抗体,为辣根过氧化物酶标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体;

VI、显色剂;

VII、g10-epsps标准品。

2. 根据权利要求1所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:所述抗体预包被酶标板的制备方法包括如下步骤:

(1)、将特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体用包被缓冲液稀释至浓度为 $1.8\sim 2.2\mu g/ml$,加至96孔酶标板, $37^\circ C$ 反应3h或 $4^\circ C$ 静置过夜;

所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液;

(2)将板孔溶液甩干后加入洗涤液洗涤,再干燥;

(3)将封闭液加至96孔酶标板, $37^\circ C$ 反应2~3h;

(4)干燥后,得抗体预包被酶标板。

3. 根据权利要求2所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:

所述碳酸盐缓冲液为 $Na_2CO_3-NaHCO_3$ 缓冲液,其浓度为0.1M,pH值为9.6;

所述特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体的包被浓度为 $1.9\sim 2.1\mu g/ml$;

所述封闭液为含BSA的碳酸盐缓冲液;该封闭液中,BSA的浓度为1%,碳酸盐缓冲液 $Na_2CO_3-NaHCO_3$ 缓冲液,其浓度为0.1M,pH值为9.6。

4. 根据权利要求2或3所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:

特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体为通过用g10-epsps重组蛋白免疫BALB/c小鼠,然后通过细胞融合、克隆化筛选制备得到单克隆抗体细胞株,接着制备小鼠腹水,经过纯化得到。

5. 根据权利要求4所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:g10-epsps为将G1中的g10-epsps基因经过优化后构建入大肠杆菌表达体系,重组表达纯化得到。

6. 根据权利要求1所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:

组分V中,辣根过氧化物酶标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的浓度为 $8\sim 12\mu g/ml$ 。

7. 根据权利要求1所述的g10-epsps定量检测试剂盒,其特征在于:

作为组分IV的 H_2SO_4 溶液,硫酸的浓度为 $1.8\sim 2.2M$ 。

8. 利用权利要求1~7所述的试剂盒进行的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)从待检样本中提取蛋白,得蛋白提取液;

(2)用g10-epsps定量检测试剂盒对蛋白提取液进行检测;

(3)通过用g10-epsps蛋白标准品制作的浓度-吸光度标准曲线,计算待检样品中的g10-epsps蛋白浓度。

9. 根据权利要求8所述的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法,其特征在于:

加入HRP标记的抗g10-epsps蛋白的多克隆抗体后的孵育温度为 $22\sim 26^\circ C$,孵育时间为

40～50分钟。

转基因蛋白g10-epsps的定量检测方法及其所用试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及转基因植物检测技术领域,尤其涉及一种转基因蛋白EPSPS的获取和定量检测方法。

背景技术

[0002] 发明人所在的研究组前期研究从假单胞杆菌(g10)中克隆到抗除草剂的EPSPS基因。EPSP合成酶(5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphatesynthase,EPSPS)是生物体内芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸生物合成过程中的关键性酶;草甘膦是通过抑制EPSP合成酶的活性而阻断芳香族氨基酸的合成最终导致受试植物死亡。但是某些细菌的EPSP合成酶的活性不被草甘膦所抑制,所以细菌EPSPS基因的表达可以使植物免受除草剂的伤害。将除草剂抗性基因EPSPS转入大豆,旨在培育具抗草甘膦优良特性的转基因大豆,提高大豆生产中的田间除草效果,降低生产成本。

[0003] 本研究组利用从假单胞杆菌中克隆的抗除草剂的EPSPS基因,构建了植物组成型表达载体pSOY19,由35S启动子驱动,可以为转基因植物提供草甘膦抗性。pSOY19质粒中只含有1种能在植物细胞中表达的基因:细菌EPSPS,位于CaMV 35S启动子的控制下。抗除草剂基因表达质粒为9557bp。插入序列EPSPS基因全长1321bp,编码一个含有440个氨基酸的多肽。通过农杆菌介导法,已将EPSPS外源基因转化大豆华春3号和Jack品种并获得转EPSPS基因的抗除草剂转基因大豆材料。

[0004] 目前转基因蛋白的常规检测方法是PCR,但是PCR方法对场地、仪器、技术人员的要求比较高,样本处理复杂,不适合大量的筛选检测。有部分转基因蛋白已经可以通过速测试纸和ELISA试剂盒的方法进行检测,但是g10-epsps为一个新引进的转基因蛋白,目前尚无该方面的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种用于准确、可靠地进行转基因蛋白g10-epsps的定量检测方法和所用的试剂盒。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种g10-epsps定量检测试剂盒,包括如下组分:

[0007] I、抗体预包被酶标板;

[0008] II、样品稀释液,为磷酸盐缓冲液;

[0009] III、洗涤液,为含Tween-20的磷酸盐缓冲液;

[0010] IV、反应终止液,为H₂SO₄溶液;

[0011] V、酶标抗体,为辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体;

[0012] VI、显色剂(为TMB显色剂);

[0013] VII、g10-epsps标准品。

[0014] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的改进:所述抗体预包被酶标板的制备

方法包括如下步骤:

[0015] (1)、将特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体用包被缓冲液稀释至浓度为1.8~2.2μg/ml,加至96孔酶标板(每孔100ul),37℃反应3h或4℃静置过夜(12h);

[0016] 所述包被缓冲液为碳酸盐缓冲液;

[0017] (2)将板孔溶液甩干后加入洗涤液洗涤,再干燥;

[0018] 例如具体可:将板孔溶液甩干,加入洗涤液,浸泡5~10min,将板孔溶液甩干,在吸水纸上拍干;

[0019] (3)将封闭液加至96孔酶标板(每孔150ul),37℃反应2~3h;

[0020] (4)干燥(例如将板孔溶液甩干,在吸水纸上拍干,用冷冻干燥机抽干)后;得抗体预包被酶标板。

[0021] 备注说明:所得的抗体预包被酶标板用真空包装机包装于铝箔袋中。

[0022] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的进一步改进:

[0023] 所述碳酸盐缓冲液为(优选)Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液,其浓度为0.1M,pH值为9.6;

[0024] 所述特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体的包被浓度为(优选)1.9~2.1μg/ml;更优选2μg/ml;

[0025] 所述封闭液为含BSA的碳酸盐缓冲液;该封闭液中,BSA的浓度为1%,碳酸盐缓冲液Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液,其浓度为0.1M,pH值为9.6。

[0026] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的进一步改进:

[0027] 特异性鼠抗g10-epsps单克隆抗体为通过用g10-epsps重组蛋白免疫BALB/c小鼠,然后通过细胞融合、克隆化筛选制备得到单克隆抗体细胞株,接着制备小鼠腹水,经过纯化得到。

[0028] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的进一步改进:g10-epsps为将G1中的g10-epsps基因经过优化后构建入大肠杆菌表达体系,重组表达纯化得到。

[0029] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的进一步改进

[0030] 组分V中,辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的浓度为8~12μg/ml(优选9~11μg/ml、更优选10μg/ml)。

[0031] 备注说明:辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的制备方法为:

[0032] 1、5mg HRP溶于纯水,加入高碘酸钠,室温反应30分钟;

[0033] 2、将5mg抗体用偶联缓冲液透析过夜;

[0034] 3、将HRP加入抗体溶液中,室温反应2小时;

[0035] 4、加入硼氢化钠封闭反应位点;

[0036] 5、PBS透析过夜,加入等量甘油保存于-20℃。

[0037] 作为本发明的g10-epsps定量检测试剂盒的进一步改进:

[0038] 作为组分IV的H₂SO₄溶液,硫酸的浓度为1.8~2.2M(优选1.9~2.1M、更优选2M)。

[0039] 本发明还同时提供了利用上述试剂盒进行的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法,包括以下步骤:

[0040] (1)从待检样本中提取蛋白,得蛋白提取液;

[0041] (2)用g10-epsps定量检测试剂盒对蛋白提取液进行检测,检测过程包括加样、孵

育、洗涤、加酶、孵育、洗涤、显色、终止和读数；

[0042] (3)通过用g10-epsps蛋白标准品制作的浓度-吸光度标准曲线,计算待检样品中的g10-epsps蛋白浓度。

[0043] 作为本发明的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法的改进:

[0044] 加入HRP标记的抗g10-epsps蛋白的多克隆抗体后的孵育温度为22~26℃(优选25℃),孵育时间为40~50分钟(优选45分钟)。

[0045] 在本发明中,所用鼠抗EPSPS为通过用EPSPS重组蛋白免疫BALB/c小鼠,然后通过细胞融合、克隆化筛选制备得到单克隆抗体细胞株,然后制备小鼠腹水,经过纯化得到。所述EPSPS标准品为将G1中的EPSPS基因经过优化后构建入大肠杆菌表达体系,重组表达纯化得到。

[0046] 本发明利用自主研发的g10-epsps单克隆抗体制备了g10-epsps定量检测试剂盒,使用双抗体夹心的ELISA来检测转基因材料中的蛋白含量。

[0047] 本发明提供的转基因蛋白EPSPS的定量检测方法准确、可靠,与已有技术相比具有操作时间短,成本低的优势。

附图说明

[0048] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0049] 图1是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的表达;

[0050] 1:诱导前;2:诱导后(约45KD)。

[0051] 图2是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的表达形式;

[0052] 1:上清;2:包涵体;3、全菌。

[0053] 图3是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的纯化效果;

[0054] 1:250mM咪唑洗脱液;2:150mM咪唑洗脱液;

[0055] 3:100mM咪唑洗脱液;4:50mM咪唑洗脱液。

[0056] 图4是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的透析效果;

[0057] 1:50mM咪唑洗脱液。

[0058] 图5是使用本发明方法检测EPSPS的标准曲线。

具体实施方式

[0059] 下文以示例性地方式对本发明进行更详细地描述。

[0060] 实施例1、EPSPS蛋白的表达纯化

[0061] (1)蛋白的小试表达

[0062] 1、载体构建

[0063] 根据蛋白序列(g10-epsps),合成基因序列,并构建入载体pET30a,得到pET30a-EPSPS阳性质粒。

[0064] 2、菌种活化:利用EMD Biosciences公司出售的商用的ET表达载体骨架,构建了g10-epsps-E阳性质粒,转化BL21(DE3),涂布LB固体培养基(卡那浓度50μg/mL)。次日,挑取单克隆菌落接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50μg/mL),37℃培养12h-14h。

[0065] 3、小试表达:次日,菌种以1:50(v:v)接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50μg/mL),

37℃培养至OD=0.4-0.6,吸取1mL菌液离心处理后作为诱导前对照。4mL菌液加入浓度为0.8mM的IPTG,25℃诱导表达6h后菌液8000rpm、4℃离心1min,收集菌体。SDS-PAGE鉴定蛋白的形式,结果显示(图1)有明显目的蛋白的表达。

[0066] 4、蛋白表达形式的鉴定:上述表达的菌体(即,上述步骤所收集的菌体)加入1mL破碎液进行超声波裂解。裂解条件:温度冰浴、功率240W、超声2s、间隔2s、时间30min。将得到的全菌离心,12000rpm、4℃离心1min,收集上清和包涵体。SDS-PAGE鉴定蛋白表达形式,结果显示(图2)目的蛋白主要以可溶形式表达。

[0067] 图2中的“2:包涵体”即指上文中的沉淀;“3:全菌”即指上文中的离心前的破碎产物。

[0068] (2)蛋白的大量表达和纯化

[0069] 1、菌种活化:固体平板上挑取pET30a-EPSPS单克隆菌落接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50μg/mL),37℃培养12h-14h。

[0070] 2、小试表达:次日,菌种以1:50(v:v)接入800mL LB液体培养基(卡那浓度50μg/mL),37℃培养至OD=0.4-0.6,加入浓度为0.8mM的IPTG,25℃诱导表达6h后菌液8000rpm、4℃离心15min,收集菌体。

[0071] 3、菌种裂解:加100mL破碎液进行超声波裂解。裂解条件:温度冰浴、功率240W、超声2s、间隔2s、时间15min。12000rpm、4℃离心15min,收集上清。

[0072] 4、上清纯化:收集的上清利用高亲和性N1树脂(即,Ni-NTA亲和层析树脂(镍柱))进行纯化,分别以50mM、100mM、150mM、200mM咪唑进行洗脱;

[0073] 收集流穿液、洗脱液。SDS-PAGE检测纯化效果,结果显示(图3)50mM咪唑洗脱时蛋白纯度最佳。用50mM,pH=8.0的Tris-HCl缓冲液将洗脱液中的咪唑透析去除,SDS-PAGE检测透析效果,结果显示(图4)蛋白透析后纯度和浓度均可行。经检测,最终目的蛋白纯度大于90%,浓度2mg/mL,蛋白量10mg。

[0074] (3)结果

[0075] pET30a-EPSPS蛋白诱导表达条件为:1PTG浓度0.8mM,诱导温度25℃,诱导时间6h。蛋白主要在上清表达,上清经N1柱纯化、透析去除咪唑,最终所得g10-epsps蛋白:浓度2mg/mL、纯度大于90%、蛋白10mg。

[0076] 实施例2、抗体制备

[0077] (1)单抗制备:

[0078] 1、免疫原制备:将表达纯化的蛋白与等体积的弗氏佐剂、YOU LONG佐剂混合乳化均匀,成油包水状态,以备免疫小鼠。

[0079] 2、免疫策略:将蛋白免疫4只Balb/c小鼠,皮下免疫3次,间隔4周,最后经ELISA检测,抗血清效价如下:

编号 效价

FL0293-1 1:243000

[0080] FL0293-2 1:243000

FL0293-3 1:243000

FL0293-4 1:243000

[0081] 3、细胞融合：最后一次免疫后两周，腹腔注射抗原（具体为g10-epsps蛋白表达纯化的蛋白）进行加强免疫，三天后进行细胞融合。将小鼠断颈处死，70%乙醇浸泡30min消毒，在超净台剪开腹腔，取出脾脏，磨碎，过80目筛网，得到脾细胞，加入SP2/0骨髓瘤细胞，在PEG4000的作用下进行细胞融合。

[0082] 4、融合筛选：将融合好的细胞铺进96孔板，用HAT培养液进行培养，三天后换液，改用HT培养液培养。10天后，取细胞培养上清进行检测。使用间接ELISA方法进行筛选，OD值>阴性对照孔2.1倍的孔判断为阳性孔。

[0083] 间接ELISA方法主要包括以下步骤：

[0084] 1)、用0.1M, pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释表达纯化的蛋白至1 μ g/ml，加入96孔酶标板，每孔100 μ l，37℃反应3h或者4℃静置过夜；

[0085] 2)、甩去板孔中液体，加入250 μ l洗涤缓冲液，静置30s，甩去板中液体，重复3次；

[0086] 3)、加入检测样本，每孔100 μ l，同时加入阳性对照（2中所取阳性小鼠血清）、阴性对照（免疫前小鼠血清）和空白对照（不加小鼠血清）37℃反应45min；

[0087] 4)、重复步骤2)；

[0088] 5)、加入HRP标记的羊抗鼠酶标二抗，每孔100 μ l，37℃反应45min。

[0089] 5、克隆化与建株：使用有限稀释法对阳性孔进行克隆化，10天后检测，将阳性克隆继续有限稀释法进行克隆化，直到得到的克隆都为阳性，可建立阳性细胞株。最终获得阳性细胞株5株。

[0090] 6、扩大培养：将建株的单克隆细胞扩大培养，并冻存于液氮中。

[0091] (2)腹水制备与纯化

[0092] 1、腹水制备：提前一周在小鼠腹腔注射矿物油，将一定数量（约 10^6 ）的细胞注射入小鼠腹腔，10天左右收集腹水，4000rpm离心，得上清即为单克隆抗体腹水。

[0093] 2、单克隆抗体纯化：腹水离心15min（4000rpm，室温），取上清10ml，在4℃搅拌下逐滴缓慢加入饱和硫酸铵至半饱和，继续搅拌30min，离心30min（13000rpm，4℃），弃上清；沉淀溶于约10ml PBS（0.01M, pH7.4）；在4℃搅拌下逐滴缓慢加入饱和硫酸铵至33%，继续搅拌30min，离心30min（13000rpm，4℃），弃上清；沉淀溶于适量10ml PBS（0.01M, pH7.4），4℃透析过夜，测定抗体含量，-20℃冻存备用。硫酸铵沉淀后继续采用Protein G小柱进行纯化，新柱子先用5ml超纯水过柱，再用5ml 0.4M PB缓冲液（pH 7.0）平衡纯化小柱；抗体过柱，过程中要求缓慢过柱，以求抗体蛋白更好的结合在结合位点上；继续10ml 0.4M PB缓冲液（pH 7.0）平衡纯化小柱；5ml 0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液（pH 2.7）洗脱结合位点上的抗体，并在洗脱液中加入1M Tris-HCl（pH 8.0）0.5ml中和甘氨酸，使pH保持为适合抗体保存的中性。

[0094] 从而得鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

[0095] 实施例3、本发明试剂盒的组装：

[0096] 1、缓冲液的配制

[0097] (1)包被缓冲液，0.1M碳酸盐缓冲液CB（Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液），pH值为9.6；

[0098] (2)稀释液，0.01M磷酸盐缓冲液PBS，pH值为7.4；

[0099] (3)洗涤液，含0.2%吐温-20的PBS；

[0100] 即，在100ml的PBS中加入0.2g的吐温-20，该PBS为0.01M磷酸盐缓冲液PBS，pH值为7.4；

[0101] (4)封闭液,含1%BSA的CB;

[0102] 即,在100ml的CB中加入1g的BSA,该CB为0.1M的 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液,pH值为9.6;

[0103] (5)终止液,2M H_2SO_4 。

[0104] 2、酶标板的制备

[0105] (1)包被

[0106] 移取一定量EPSPS抗体(实施例2所得鼠抗g10-epsps单克隆抗体)于所需体积的包被缓冲液中,使其浓度约为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$,配置成包被工作液。将包被工作液按每孔 $100\mu\text{L}$ 加入酶标板微孔, 4°C 静置过夜或者 37°C 反应3h(注意要防止水分蒸发)。

[0107] (2)封闭

[0108] 在CB缓冲液(pH9.6)中加入1%的BSA,配置成封闭工作液(封闭液)。

[0109] 酶标板利用洗涤液以洗板机吸干-洗涤二次(洗涤时浸泡5~10min),将板条在洁净的吸水纸上拍干。

[0110] 将封闭工作液按每孔 $150\mu\text{L}$ 加入微孔, 37°C 烘焙3小时。

[0111] (3)抽干密封

[0112] 弃去封闭液,将板条在洁净的吸水纸上拍干,放入冷冻真空干燥机抽干3小时,真空热封。

[0113] 3、EPSPS标准品冻干粉的制备

[0114] 大肠杆菌E.coli中原核表达并通过亲和纯化的His-EPSPS(实施例2所得),N端带有6个His标签,其母液浓度为 $3\text{mg}/\text{ml}$,用稀释液稀释到 $900\text{ng}/\text{ml}$,3mL棕色玻璃瓶加入 $100\mu\text{L}$ $900\text{ng}/\text{ml}$ 标准品,冷冻干燥机过夜抽干得到标准品冻干粉,即作为组分VII的EPSPS标准品(g10-epsps标准品)。

[0115] 4、酶标记抗体工作液的配置

[0116] 酶标抗体的制备:取纯化的特异性兔多抗,与HRP进行偶联,得到酶标记抗体。

[0117] 取一定量的酶标记抗体加入到稀释液中,充分混匀,使其终浓度为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$, $2-8^\circ\text{C}$ 避光保存;作为组分V的酶标抗体。

[0118] 即,酶标抗体,为辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

[0119] 5、样品稀释液,为磷酸盐缓冲液。

[0120] 6、试剂盒的组装

[0121]

名称	数量
预包被酶标板	1块
标准品冻干粉	2瓶
酶标记抗体工作液	1瓶
样品稀释液	2瓶
显色剂	1瓶
终止剂	1瓶
洗涤液	1瓶
说明书	1份

[0122] 显色剂,为TMB显色剂。

- [0123] 实施例4、使用本发明试剂盒检测植物中的转基因蛋白EPSPS
- [0124] (1)准备标准品和未知浓度样品
- [0125] 1)标准品配制:
- [0126] 用1mL稀释液溶解EPSPS标准品冻干粉,此溶液浓度为2ppb;
- [0127] 取2ppb EPSPS标准品300 μ L,加入TBA缓冲液(0.1M Tris,0.1M Na₂B₄O₇•10H₂O,0.01M MgCl₂,0.05%(v/v)Tween-20,pH 7.8)300 μ L,此溶液浓度为1ppb;
- [0128] 取1ppb EPSPS标准品300 μ L,加入TBA缓冲液300 μ L,此溶液浓度为0.5ppb;
- [0129] 取0.5ppb EPSPS标准品300 μ L,加入TBA缓冲液300 μ L,此溶液浓度为0.25ppb;
- [0130] 取0.25ppb EPSPS标准品300 μ L,加入TBA缓冲液300 μ L,此溶液浓度为0.125ppb;
- [0131] 2)未知浓度样品的处理:
- [0132] (1)叶片前处理方法:取5-10mm²的叶片样本,放入1.5mL离心管中捣碎,加入250 μ L的TBA缓冲液,振荡混匀5分钟,4000rpm离心3分钟,取100 μ L上清用于分析。
- [0133] 种子前处理方法:取0.1g碾碎后的种子样本,放入1.5mL离心管中,加入1mLTBA缓冲液,振荡混匀5分钟,4000rpm离心3分钟,取100 μ L上清用于分析。
- [0134] 散粮前处理方法:取0.1g碾碎后的散粮样本,放入1.5mL离心管中,加入1mLTBA缓冲液,振荡混匀5分钟,4000rpm离心3分钟,取100 μ L上清用于分析。
- [0135] (2)加标准品或未知浓度样品:
- [0136] 将100 μ L的TBA缓冲液(空白对照)/标准品/未知浓度样品加入到对应的微孔中,轻轻振荡混匀,25℃避光环境中反应45min。
- [0137] (3)洗板:
- [0138] 将孔内液体甩干,每次洗涤时,用250 μ L洗涤液/孔,充分洗涤3次,每次间隔1min,用吸水纸拍干。
- [0139] (4)加酶标抗体:
- [0140] 加入酶标抗体100 μ L/孔,轻轻振荡混匀,25℃避光环境中反应45min,取出重复步骤(3)所述的洗板。
- [0141] (5)显色:
- [0142] 加入显色剂100 μ L/孔,置于25℃避光环境中反应15min。
- [0143] (6)终止与测定:
- [0144] 加入100 μ L终止液/孔,轻轻振荡混匀,酶标仪设定至450nm,测定每孔OD值(优选用双波长450/630nm进行检测,在5min内读完数据)。
- [0145] (7)计算:
- [0146] 利用统计学绘图软件,根据所测定的标准品的OD值绘制四参数拟合标准曲线,如图5所示;通过标准曲线和未知浓度样品的OD值就可计算出未知样品中EPSPS的浓度。
- [0147] (8)结果:如表1所示。
- [0148] 表1、加标样品检测效果

[0149]

样本 (n=6)	加标浓度 (ug/kg)	计算浓度 (ug/kg)	回收率 (%)	RSD(%)
大豆叶片	2	2.3	115	7
	0.8	0.78	97.5	5
玉米叶片	2	22	110	13

[0150]

	0.8	0.81	101.3	12
棉花叶片	2	24	120	11
	0.8	0.78	97.5	11
大豆种子	2	22	110	7
	0.8	0.79	98.8	14
玉米种子	2	21	105	11
	0.8	0.8	100	8
棉花种子	2	22	110	12
	0.8	0.78	97.5	13
散粮	2	19	95	8
	0.8	0.76	95	7

[0151] 由表1结果可知,使用本发明的方法检测植物中的转基因蛋白g10-epsps,其加标回收率在95%-120%之间,说明:本发明的检测植物中的转基因蛋白g10-epsps的方法具有较好的准确性。

[0152] 实施例5、使用本发明试剂盒检测植物中的转基因蛋白EPSPS

[0153] 1、利用g10-epsps定量检测试剂盒检测转基因大豆中EPSPS的表达;

[0154] 通过EPSPS基因赋予转基因植物除草剂抗性,可以用草甘膦进行检测;直接喷施200ml/亩草甘膦可以杀死全部非转基因大豆。

[0155] 转基因大豆除草剂筛选的阳性株系取顶端叶片,用g10-epsps定量检测试剂盒检测插入序列(细菌EPSPS)在转基因阳性植株中的表达量。

[0156] 1.1转基因大豆研究材料:安徽试验田的两个转基因大豆株系V1时期(2-3片三出复叶)根,茎,叶组织。

[0157] 1.2定量检测研究结果

[0158] 安徽大田三个重复试验田的两个转基因大豆株系,株系1(L1),株系2(L2)V1时期(2-3片三出复叶发育时期),顶端三出复叶,茎,根,取材100mg鲜重材料,用g10-epsps定量检测试剂盒进行g10-epsps表达量检测。

[0159] 1.2.1各个组织器官的总蛋白提取

[0160] a.新鲜组织:称取100mg新鲜的组织用1ml的TBA缓冲液(0.1M Tris,0.1M Na₂B₄O₇·10H₂O,0.01M MgCl₂,0.05%(v/v)Tween-20at pH 7.8和0.2%(w/v)L-ascorbic

acid)研磨组织,用mirocloth过滤膜(Fisher Scientific,Pittsburgh,PA)过滤并取上清液。12000rpm离心,取上清为大豆新鲜组织蛋白提取液待用。

[0161] b.干籽粒:取100mg干籽粒干粉,加入1mlTBA缓冲液,12000rpm离心,取上清为大豆干籽粒蛋白提取液待用。

[0162] 采用g10-epsps定量检测试剂盒检测样本中的蛋白含量。

[0163] 对以上新鲜组织和干籽粒的蛋白提取液样品进行 10^2 , 10^3 , 10^4 梯度稀释,选取最佳的稀释度按照实施例4中(2)~(6)步骤进行定量分析。

[0164] c. EPSPS蛋白吸收峰值读数是以 $\mu\text{g/g}$ 鲜重(FW)为单位进行,最后计算各个试验点的每种组织EPSPS蛋白含量的算术平均数、标准差(SD)。

[0165] 1.2.2定量检测结果

[0166] 表2、转基因大豆株系1(L1)叶,茎,根,籽粒EPSPS表达量

[0167]

转基因材料编号	叶 ($\mu\text{g/g}$)	茎 ($\mu\text{g/g}$)	根 ($\mu\text{g/g}$)	籽粒 ($\mu\text{g/g}$)
I-L1-1	171.53	109.10	137.16	270.4974
I-L1-2	193.41	92.52	164.67	188.2607
I-L1-3	49.93	49.25	112.09	1004.943
II-L1-1	137.63	61.68	122.48	256.5338
II-L1-2	144.29	98.77	66.64	873.3395
II-L1-3	88.24	84.71	62.02	278.097
III-L1-1	218.61	64.13	447.07	503.9234
III-L1-2	126.08	26.90	87.16	352.0544
III-L1-3	107.06	16.10	137.16	831.9432
平均值	137.42	67.02	149.91	506.6214
标准差	52.51	32.20	125.05	313.13

[0168] 表3、转基因大豆株系2(L2)叶,茎,根,籽粒EPSPS表达量

[0169]

转基因材料编号	叶 ($\mu\text{g/g}$)	茎 ($\mu\text{g/g}$)	根 ($\mu\text{g/g}$)	籽粒 ($\mu\text{g/g}$)
I-L2-1	77.94	43.65	30.49	420.8835
I-L2-2	58.01	68.21	65.98	309.1134
I-L2-3	25.06	25.48	25.02	218.2268
II-L2-1	82.22	28.35	25.02	703.4291
II-L2-2	50.50	29.28	48.05	467.3463
II-L2-3	69.87	55.65	51.99	1019.154
III-L2-1	75.99	26.50	28.03	403.8307
III-L2-2	53.42	27.47	12.64	611.6775
III-L2-3	70.75	29.56	10.14	313.1912
平均值	63.62	39.01	35.37	496.3169
标准差	19.52	15.65	16.97	247.62

[0170] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明,但本发明并不局限于上述,即不意味着本发明必须依赖上述才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明所选用原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

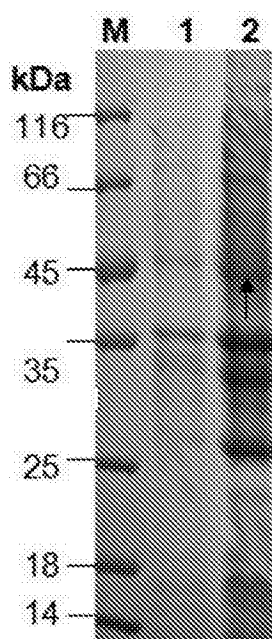


图1

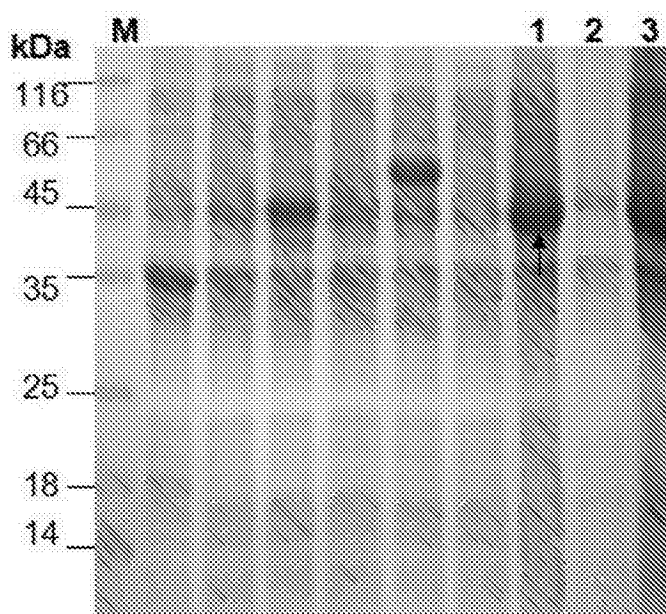


图2

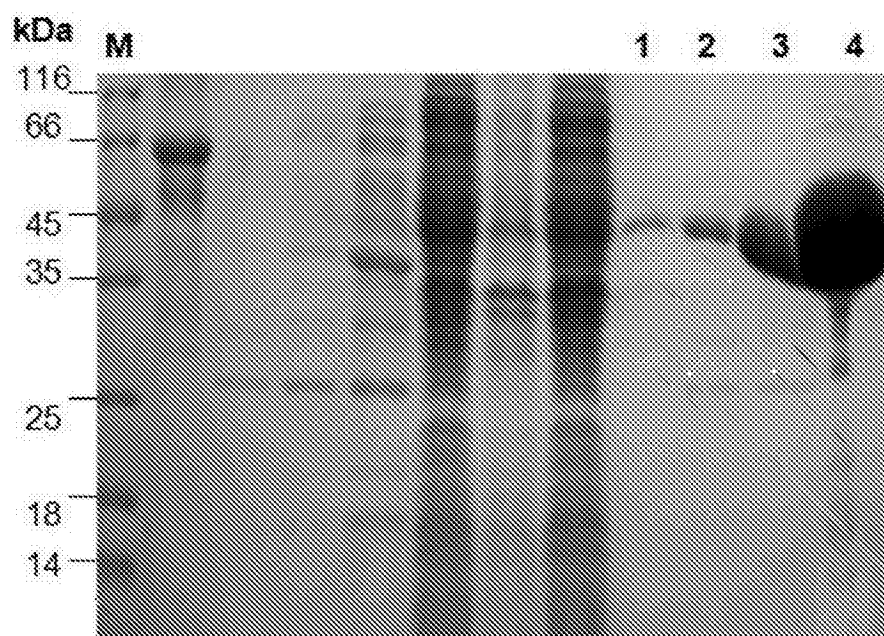


图3

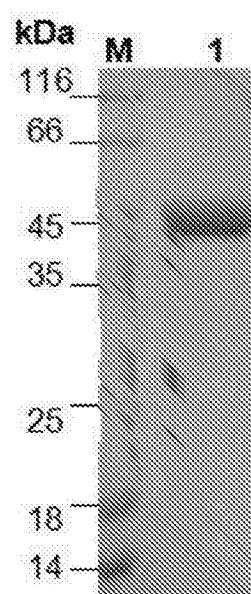


图4

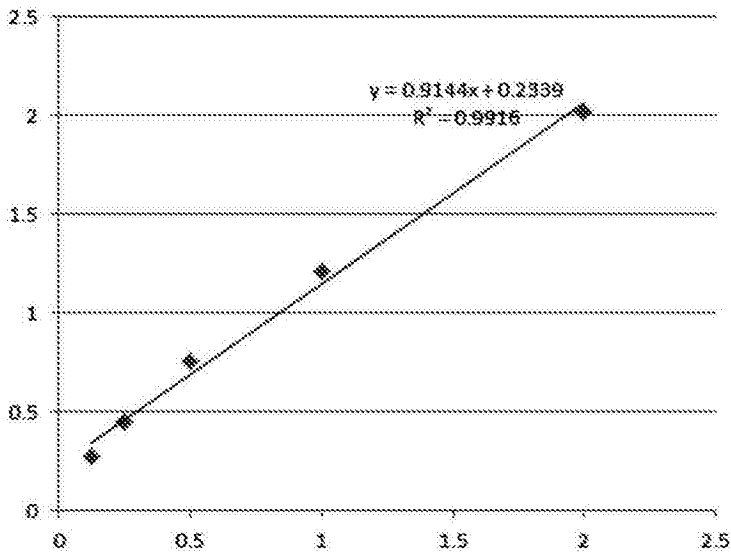


图5

专利名称(译)	转基因蛋白g10-epsps的定量检测方法及其所用试剂盒		
公开(公告)号	CN105866414A	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201610110917.6	申请日	2016-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
[标]发明人	寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿 武爱波 徐伟		
发明人	寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿 武爱波 徐伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/573 G01N33/543 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/573 G01N2333/91182		
代理人(译)	金祺		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种g10-epsps定量检测试剂盒，包括如下组分：抗体预包被酶标板；样品稀释液，为磷酸盐缓冲液；洗涤液，为含Tween-20的磷酸盐缓冲液；反应终止液，为H₂SO₄溶液；V、酶标抗体，为辣根过氧化物酶标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体；VI、显色剂；VII、g10-epsps标准品。本发明还同时公开了利用试剂盒进行的定量检测植物中转基因蛋白g10-epsps的方法，包括以下步骤：从待检样本中提取蛋白，得蛋白提取液；用g10-epsps定量检测试剂盒对蛋白提取液进行检测；通过用g10-epsps蛋白标准品制作的浓度-吸光度标准曲线，计算待检样品中的g10-epsps蛋白浓度。

