



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108614104 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 201810431452.3

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2018.05.08

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108614104 A

CN 103439399 A, 2013.12.11

CN 107290545 A, 2017.10.24

CN 102998361 A, 2013.03.27

(43) 申请公布日 2018.10.02

CN 102262134 A, 2011.11.30

(73) 专利权人 中国农业科学院生物技术研究所
地址 100044 北京市海淀区中关村南大街
12号

CN 102353726 A, 2012.02.15

CN 102279227 A, 2011.12.14

CN 103995077 A, 2014.08.20

(72) 发明人 李亮 金芈军 林敏 宛煜嵩
刘卫晓 武利庆 刘刚 柳方方

审查员 王在竹

(74) 专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务
所(普通合伙) 11548

代理人 李静

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

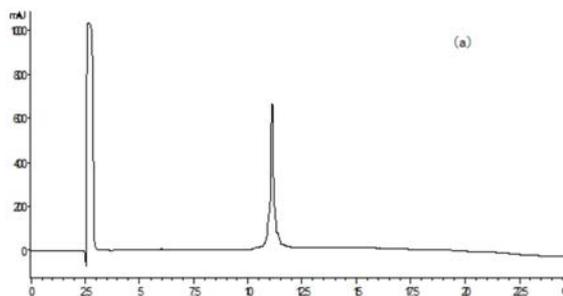
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54) 发明名称

一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法

(57) 摘要

本发明公开了一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,该方法包括如下步骤:采用同位素稀释质谱方法以及氨基酸分析法对G2 EPSPS蛋白纯品的含量进行准确测定,最后采用重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,以ELISA法进行量值核验,并进行均匀性和稳定性检验,同时进行标准物质加入稳定剂后储存稳定性验证。本发明制备的G2 EPSPS蛋白标准物质对于检测抗草甘膦转基因作物中G2 EPSPS蛋白是否合理表达至关重要。本发明提供一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,具有良好的可靠性、准确性、溯源性。



1. 一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 采用两种精确的蛋白质含量测定方法,即同位素稀释质谱方法和氨基酸分析法对G2 EPSPS蛋白纯品进行含量测定;

(2) 采用重量法-容量法根据已经进行含量测定的G2 EPSPS蛋白纯品配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,并采用ELISA法进行量值核验,进行均匀性稳定性检验;

(3) 配置的标准溶液中加入蛋白稳定剂,以保证蛋白标准物质的稳定储存;

所述蛋白稳定剂包括1.5%甘氨酸、2.5%甘油、0.1%EDTA、0.01%叠氮化钠和1%粉苹婆提取物;所述粉苹婆提取物的提取方法为:取粉苹婆新鲜叶片,捣碎,加5倍重量份数的水回流提取3次,合并滤液,活性炭脱色,过滤,蒸干制成。

2. 根据权利要求1所述的G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,其特征在于,所述步骤(1)中同位素稀释质谱法的步骤为:

(1) G2 EPSPS蛋白溶液中加入的同浓度标记氨基酸混合溶液,氨基酸包括脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸;

(2) 加入氨基酸混合液的G2 EPSPS蛋白溶液在 $(110.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的烘箱中进行水解,水解后上机测定脯氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的相对比例,确定水解时间为48 h;

(3) 另外氨基酸分析法过程中G2 EPSPS蛋白溶液其水解条件与IDMS是相同的,不同的是测定时用国家氨基酸标准物质作为外标,采用柱前衍生化方法进行外标法定量,即分别在G2 EPSPS蛋白质纯品水解液中以及苯丙氨酸标准品溶液中加入配置好的衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC)乙腈溶液和三乙胺乙腈溶液在室温下放置50min,衍生结束后加入正己烷溶液,静置大约10min,取下层溶液,对衍生后的水解液以及苯丙氨酸标准品溶液进行液相分析。

3. 根据权利要求1所述的G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,其特征在于,所述步骤(2)中将同位素稀释质谱方法进行准确含量测定的G2 EPSPS蛋白纯品采用重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,并用ELISA法进行量值核验。

一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法。

背景技术

[0002] 自1996年以来,抗草甘膦作物已成为最重要的转基因作物。美国自1998年开始大面积种植抗草甘膦农作物,极大推动了抗草甘膦农作物在全球范围内的发展,并产生了巨大的经济效益。但另一方面,转基因作物花粉携带抗草甘膦在环境中漂移,可能导致抗草甘膦基因的扩散而产生超级杂草,造成环境的污染。因此制备G2 EPSPS蛋白标准物质对于检测抗草甘膦转基因作物中G2 EPSPS蛋白是否合理表达至关重要。

[0003] 对抗草甘膦转基因作物中的G2 EPSPS蛋白进行定量检测,并保证检测的准确、可靠和有效性,需要计量标准的支撑。在保证抗草甘膦转基因作物检测结果的可比性、溯源性,推进抗草甘膦转基因作物检测方法标准化等方面,G2 EPSPS蛋白标准物质发挥着十分重要的作用。本发明提供一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,具有良好的可靠性、准确性、溯源性。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法。

[0005] 一种G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 采用两种精确的蛋白质含量测定方法即同位素稀释质谱方法和氨基酸分析法对G2 EPSPS蛋白纯品进行含量测定;

[0007] (2) 采用重量法-容量法根据已经进行含量测定的G2 EPSPS蛋白纯品配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,并采用ELISA法进行量值核验,进行均匀性稳定性检验。

[0008] (3) 配置的标准溶液中加入蛋白稳定剂,以保证蛋白标准物质的稳定储存

[0009] 所述步骤(1)中G2 EPSPS蛋白溶液中加入的同浓度标记氨基酸混合溶液包括脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸。加入氨基酸混合液的G2 EPSPS蛋白溶液在 (110.0 ± 0.5) °C的烘箱中进行水解,水解不同的时间后上机测定脯氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的相对比例进而确定合适水解时间为48h。另外氨基酸分析法过程中G2 EPSPS蛋白溶液其水解条件与IDMS是相同的,不同的是测定时用国家氨基酸标准物质作为外标,采用柱前衍生化方法进行外标法定量,即分别在G2 EPSPS蛋白质纯品水解液中以及苯丙氨酸标准品溶液中加入配置好的衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC)乙腈溶液和三乙胺乙腈溶液在室温下放置50min左右,衍生结束后加入一定量正己烷溶液,静置10min,取下层溶液,对衍生后的水解液以及苯丙氨酸标准品溶液进行液相分析。此发明采用同位素稀释质谱法测定G2 EPSPS蛋白纯品纯度的同时采用了氨基酸分析法对G2 EPSPS蛋白纯品纯度进行了测定。

[0010] 所述步骤(2)中将同位素稀释质谱方法进行准确含量测定的G2 EPSPS蛋白纯品采用重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,并用ELISA法进行量值核验。

[0011] 所述步骤(3)中蛋白稳定剂包括1.5%氨基酸,2.5%甘油,0.1%EDTA,0.01%叠氮

化钠。

[0012] 本发明的有益效果:本发明的G2 EPSPS蛋白溶液标准物质定值方法是通过同位素稀释质谱法以及氨基酸分析法进行G2 EPSPS蛋白纯品含量的测定,然后根据已经进行含量测定的G2 EPSPS蛋白纯品,采用重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质。同位素稀释质谱法和重量法-容量法这两种定值方法均是标准物质定值的基准方法(其特性值在不参考相同特性或量的其他标准的情况下被采纳,被指定或广泛公认具有国家最高计量学品质的测量方法),保证了定值结果的准确性和溯源性,此外本发明在配置的标准物质中加入相应的稳定剂,保证了蛋白质的稳定保存。

附图说明

[0013] 图1是G2 EPSPS蛋白高效凝胶排阻色谱图。

[0014] 图2是G2 EPSPS蛋白纯度芯片电泳测定结果。

[0015] 图3是G2 EPSPS蛋白基质辅助激光诱导解吸飞行时间质谱图。

[0016] 图4是蛋白水解液提取离子流色谱图。

[0017] 图5是不同水解时间下氨基酸的相对比例。

具体实施方式

[0018] 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。

[0019] 下述实验采用如下所述的实验材料

[0020] 1. 实验主要仪器

[0021] Agilent 2100生物芯片分析系统,安捷伦公司,美国;

[0022] 高效液相色谱仪,Agilent 1200,安捷伦公司,美国;

[0023] 基质辅助激光诱导解吸飞行时间质谱仪,Ultraflex,布鲁克公司,美国;

[0024] 三重串联四级杆质谱仪,5500,AB公司,美国;

[0025] 涡旋混匀器:MS2型,德国IKA公司;

[0026] 掌上离心机:Mln1-6K,中国珠海黑马公司;

[0027] 烘箱:UFE500,德国Mettler公司;

[0028] 移液器(10,20,100,200,1000ul):法国Gilson公司;

[0029] 天平:ME235S型,感量0.01mg,德国Satorius公司;

[0030] 天平:UMX5型,感量0.1ug,德国Satorius公司;

[0031] 2. 实验主要试剂

[0032] G2蛋白溶液,由生物技术服务公司重组表达和纯化;

[0033] Agilent 2100蛋白质分析试剂盒,安捷伦公司,美国;

[0034] 超纯水,经MilliQ超纯水系统纯化,电阻率达到18.2M Ω ·cm;

[0035] 乙腈,色谱纯,J.T.Baker,美国;

[0036] 三氟乙酸,分析纯,Sigma公司;

[0037] CHCA基质,布鲁克公司,美国;

[0038] 全氟庚酸:Sigma-Aldrich公司,美国;

- [0039] 盐酸:优级纯,北京化学试剂公司产品;
- [0040] 脯氨酸:fluka公司,美国;
- [0041] 缬氨酸:fluka公司,美国;
- [0042] 苯丙氨酸:fluka公司,美国;
- [0043] 苯丙氨酸标准物质:Sigma公司,美国;
- [0044] 脯氨酸同位素标记物:美国剑桥同位素实验室;
- [0045] 缬氨酸同位素标记物:美国剑桥同位素实验室;
- [0046] 苯丙氨酸同位素标记物:美国剑桥同位素实验室;
- [0047] 实施例1

[0048] (一)标准物质原料基本理化性质的表征:

[0049] (1)采用高效液相排阻色谱对G2 EPSPS蛋白进行纯度的测定:从纯化好的G2转基因蛋白中取出7个子样,用含有0.1%TFA的水将样品稀释到1mg/mL,上机进行纯度分析,典型色谱图如图1所示。结果如表1所示,平均纯度为96.6%。

[0050] 表1 G2 EPSPS蛋白高效液相色谱纯度分析结果(%)

[0051]	分析次数	1	2	3	4	5	6	7	平均值
	纯度	96.6	96.7	96.5	96.7	96.7	96.6	96.7	96.6

[0052] (2)凝胶排阻色谱后采用芯片电泳对G2 EPSPS蛋白的纯度进行分析,平行取5个G2蛋白子样进行分析,结果如图2所示,在50kD出可以观察到目的蛋白条带,其分子量与理论蛋白分子量一致(46.6kD)。

[0053] (3)采用基质辅助激光诱导解吸飞行时间质谱仪对G2 EPSPS蛋白分子量进行测定,即将G2蛋白用含有0.1%TFA的水溶液稀释成0.1mg/mL的溶液,与CHCA基质饱和溶液等比例混合后点在靶上,干燥后推入质谱仪中进行测定。G2 EPSPS蛋白质谱图如图3,由图3可知50kD处可观察到G2转基因蛋白的主峰,25kD处为双电荷峰,34kD处为杂蛋白峰。平行分析7个样品分析,其结果如表2所示。

[0054] 表2 G2 EPSPS蛋白分子量测定结果

	G2 转基因 蛋白	1	2	3	4	5	6	7	8	9
[0055]	分子量	5009 5.698	5009 2.015	5009 7.254	5008 9.95	5009 2.621	5009 5.084	5009 5.767	5009 5.698	5009 2.015
	平均值	50094.055								

[0056] (二)标准物质定值:

[0057] 标准物质的定值是对标准物质特性量值赋值的全过程,必须保证其量值的准确和溯源性。

[0058] (1)同位素稀释质谱法测定G2 EPSPS蛋白质纯品含量

[0059] 取G2 EPSPS蛋白,在室温平衡1hr后打开样品管,将内装溶液混合均匀后转入离心管中,用新配制的0.1mol/L的盐酸将其配制成0.1mg/mL的溶液。取20 μ L稀释的G2转基因蛋

白溶液,加入同浓度的标记氨基酸混合溶液,加入6mol/L的盐酸,通氮除氧后密封,在(110.0±0.5)℃的烘箱中进行水解。氮气吹干后用0.1mol/L的盐酸复溶,溶液经过0.45μm滤膜过滤后上机测定,HPLC纯度测定条件如下:

[0060] 流动相A:0.1%TFA的水溶液

[0061] 流动相B:MeCN

[0062] 色谱柱:Phenomenex KINETEX C18色谱柱(150mm×2mm)

[0063] 流动相梯度如下:

	时间/min	流速(ml/min)	A(%)	B(%)
[0064]	0.00	0.2	91.00	9.00
	10.00	0.2	91.00	9.00

[0065] 质谱信号采用多反应监测模式,对于脯氨酸的检测,分别监测116->70(Pro)和121->74(标记Pro)的离子对;对于缬氨酸的检测,分别监测118->72(Val)和123->76(标记Val)的离子对;对于苯丙氨酸的检测,分别监测166->120(Phe)和174->128(标记Phe)的离子对。典型的提取离子流色谱图如图4所示。

[0066] 确定水解时间:取G2蛋白样品,按照上述配制、水解和测定过程,分别水解不同的时间后上机测定脯氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸的相对比例,结果如图5所示。从图5可以看出,在经过24小时的水解之后各个氨基酸的含量到达了一个平台,水解时间为48小时,各个氨基酸的比例达到峰值,进一步延长会略微导致各个氨基酸相对比例的下降,因此水解时间定在48小时。

[0067] 从母液中取出15份子样,水解48小时进行液相色谱-同位素稀释质谱联用分析。每个子样平行分析三次,取其平均值,结果如表3所示。

[0068] 表3母液中G2蛋白浓度的同位素稀释质谱方法测定结果(μg/g)

	1	2	3	Average
[0069] G2-1	763.6	759.0	777.3	766.6
G2-2	784.7	781.4	779.2	781.8
G2-3	784.0	770.2	758.2	770.8
G2-4	791.2	771.3	782.7	781.7
G2-5	794.3	769.0	773.9	779.1
G2-6	796.3	772.3	791.8	786.8
G2-7	781.2	772.5	786.6	780.1
G2-8	770.6	778.8	778.4	776.0
G2-9	785.6	799.8	777.9	787.8

[0070]	G2-10	801.6	769.6	773.3	781.5
	G2-11	767.6	771.2	784.7	774.5
	G2-12	788.3	787.0	778.4	784.6
	G2-13	764.9	795.7	792.2	784.3
	G2-14	810.3	788.6	801.2	800.0
	G2-15	771.7	769.2	800.3	780.4
	Average	/	/	/	781.1

[0071] 分别对表3中结果进行正态分布检验、Dixon检验表明表3中15个结果符合正态分布、无异常值。

[0072] 接着根据表3中15个子样的分析结果进行母液的瓶内均匀性检验,结果如表4所示:

[0073] 表4 G2蛋白母液瓶内均匀性检验结果

参数	值
N	45
Q1	2550.6
Q2	4043.8
m	15
v1	14
v2	30
F	1.35

[0075] 计算得到的F值为1.35,小于 $F(0.05, 14, 30) = 2.03$,通过瓶内均匀性检验,取15个子样测定结果的平均值781.1 $\mu\text{g/g}$ 作为母液中G2蛋白质的浓度。

[0076] (2)氨基酸分析法测定G2 EPSPS蛋白质纯品含量

[0077] 从母液中取出5份子样,按照(1)中水解方案水解48小时。分别在G2EPSPS蛋白质纯品水解液中以及配置好的苯丙氨酸标准品溶液中加入配置好的衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC)乙腈溶液和三乙胺乙腈溶液在室温下放置50min左右,衍生结束后加入一定量正己烷溶液,静置10min,取下层溶液。对衍生后的水解液以及苯丙氨酸标准品溶液进行液相分析。液相分析条件如下:

[0078] 流动相A:0.12mol/L醋酸钠溶液(PH6.5)-乙腈(95:5)

[0079] 流动相B:80%乙腈

[0080] 色谱柱:Venusil AA氨基酸分析柱(4.6mm \times 250mm,5 μm)

[0081] 流动相梯度如下:

时间/min	A(%)	B(%)
0.00	100.00	0.00
18.00	87.00	13.00
[0082] 32.00	70.00	30.00
33.00	0.00	100.00
38.00	100.00	0.00

[0083] 由色谱峰面积求得样品水解后苯丙氨酸的浓度,进而推算出G2 EPSPS蛋白纯品浓度,结果如表5所示:

[0084] 表5母液中G2蛋白浓度的氨基酸分析方法测定结果($\mu\text{g/g}$)

	1	2	3	Average
[0085] G2-1	773.4	779.3	787.8	756.8
G2-2	775.7	774.1	765.0	771.6
G2-3	774.2	765.4	772.3	767.3
G2-4	780.2	778.4	772.5	777.0
G2-5	785.3	778.1	775.8	779.7

[0086] 均值	/	/	/	775.8
-----------	---	---	---	-------

[0087] 分别对表5中结果进行正态分布检验、Dixon检验表明表5中结果符合正态分布、无异常值。

[0088] (3) G2 EPSPS蛋白标准物质定值

[0089] G2 EPSPS蛋白标准物质是由G2 EPSPS蛋白母液用PBS溶液稀释得到。G2 EPSPS蛋白纯品的含量采用同位素稀释质谱方法以及氨基酸分析法进行准确测定,然后采用重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白溶液标准物质,如表6所示。

[0090] 表6 G2 EPSPS蛋白溶液标准物质稀释表

标准物质编号	吸取溶液质量/g	枪头质量/g	吸取溶液后枪头质量/g	枪头液体质量/g	加入母液质量/g	溶液浓度 $\mu\text{g/mL}$	稀释比
[0091] 1#	0.02286	0.29373	0.29638	0.00265	0.02021	0.01579	49480

[0092] 重量法-容量法配制出G2 EPSPS蛋白标准物质溶液浓度为 $0.01579\mu\text{g/mL}$,随后以配制值作为标准值,以ELISA法进行量值核验,并进行了均匀性和稳定性检验,结果良好。

[0093] 进行稳定性检验过程中发现,标准物质1#在 -20°C 条件下能稳定保存7天,而在 4°C 条件下样品7天内是不稳定的,因此在标准物质中加入了相应的稳定剂,即1.5%氨基酸类(甘氨酸)+2.5%甘油+0.1%EDTA+0.01%叠氮化钠,将样品 4°C 条件下放置7天并采用ELISA双抗夹心法对加入稳定剂的标准物质进行检验,结果如表7所示。

[0094] 表7含稳定剂及未含稳定剂的G2 EPSPS蛋白标准物质溶液浓度(4℃)

时间/天	0	1	2	4	7
未加稳定剂	0.01588	0.014974	0.014837	0.010709	0.004833

加入稳定剂	0.01579	0.015898	0.01627	0.01558	0.01608
-------	---------	----------	---------	---------	---------

[0097] 表7结果表明加入稳定剂后的标准物质在4℃条件下能稳定保存7天。对于此标准物质如果需要短时间内4℃放置时,可以考虑加入一定的稳定剂,以保证G2 EPSPS蛋白标准物质溶液的稳定。

[0098] 为了使标准物质保存的时间更长,能够达到10天的时间,在1.5%氨基酸类(甘氨酸)+2.5%甘油+0.1%EDTA+0.01%叠氮化钠的基础上,加入1%粉苹婆提取物,所述粉苹婆提取物的提取方法为:取粉苹婆新鲜叶片,捣碎,加5倍重量份数的水回流提取3次,合并滤液,活性炭脱色,过滤,蒸干制成。

[0099] 将样品4℃条件下放置10天并采用ELISA双抗夹心法对加入稳定剂的标准物质进行检验,结果如表8所示。

[0100] 表8含新稳定剂及未含稳定剂的G2 EPSPS蛋白标准物质溶液浓度(4℃)

时间/天	0	1	2	4	7
未加稳定剂	0.01588	0.014974	0.014837	0.010709	0.004833
加入新稳定剂	0.01581	0.015899	0.01629	0.01562	0.01621

[0102] 表8结果表明加入稳定剂后的标准物质在4℃条件下能稳定保存10天。对于此标准物质如果需要短时间内4℃放置时,可以考虑加入该稳定剂,以保证G2 EPSPS蛋白标准物质溶液的稳定。

[0103] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行了描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明涉及精神的前提下,本领域普通工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

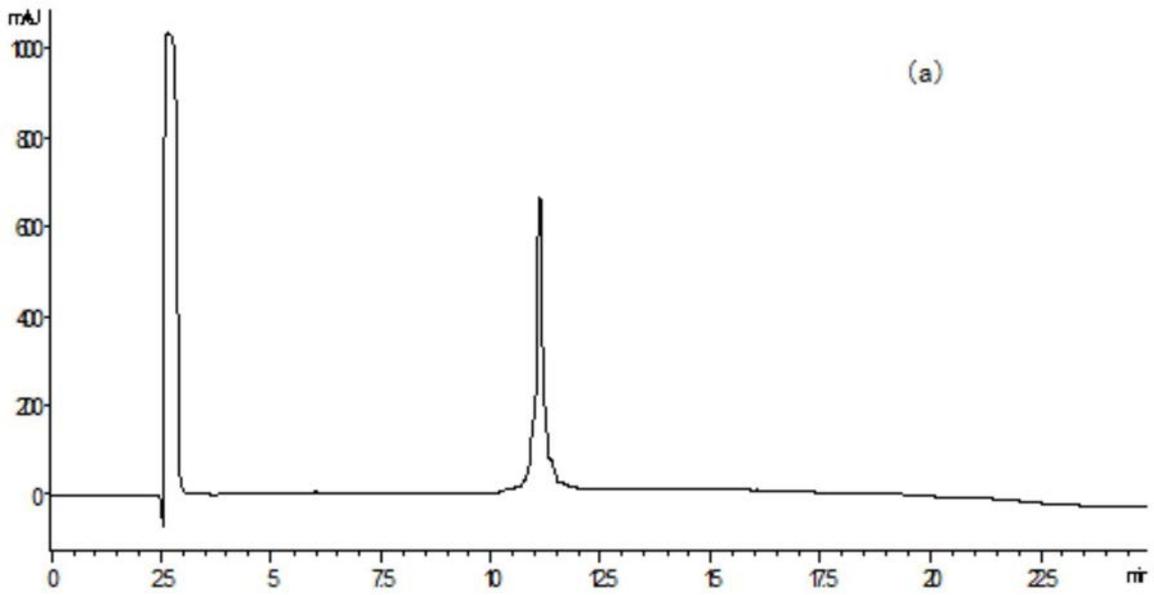


图1

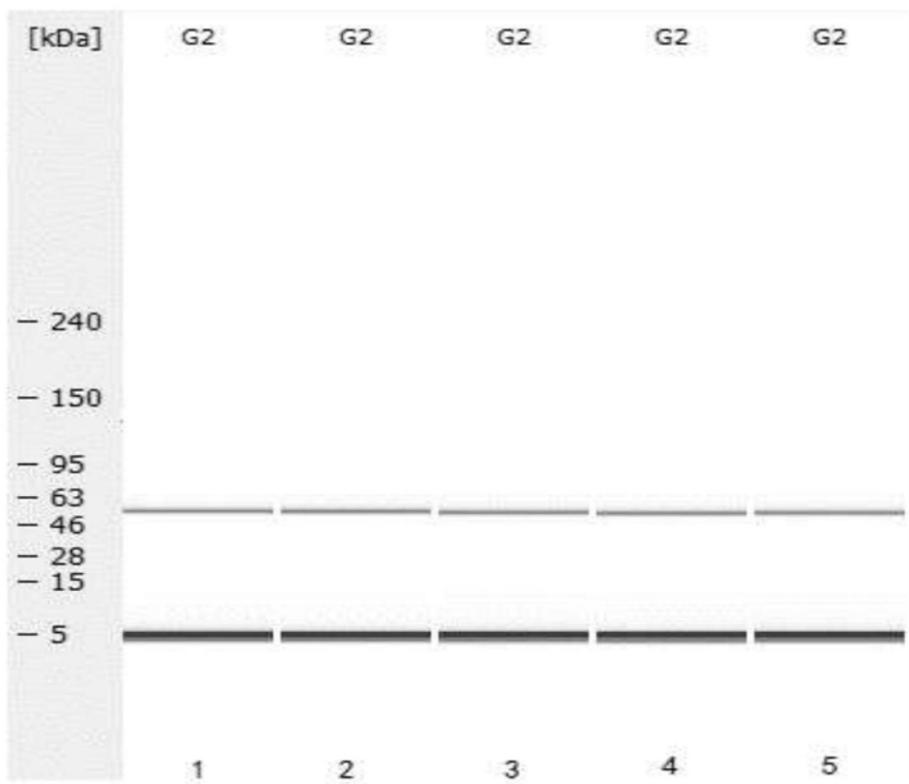


图2

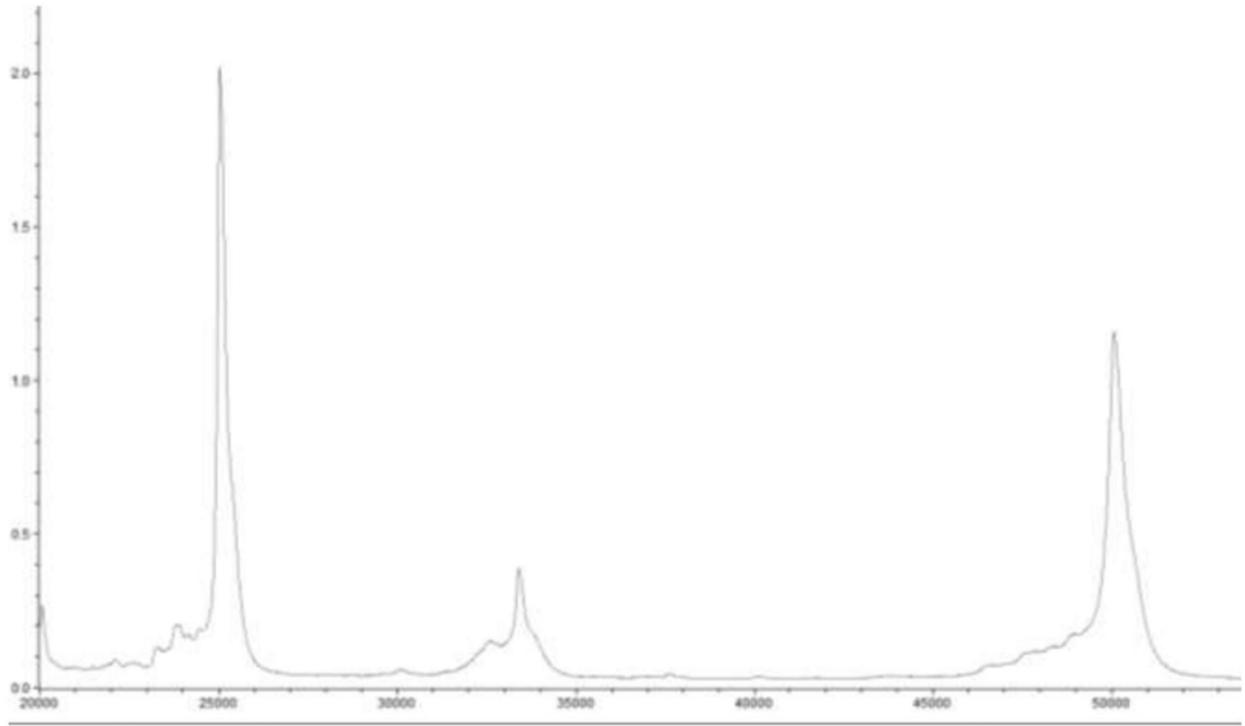


图3

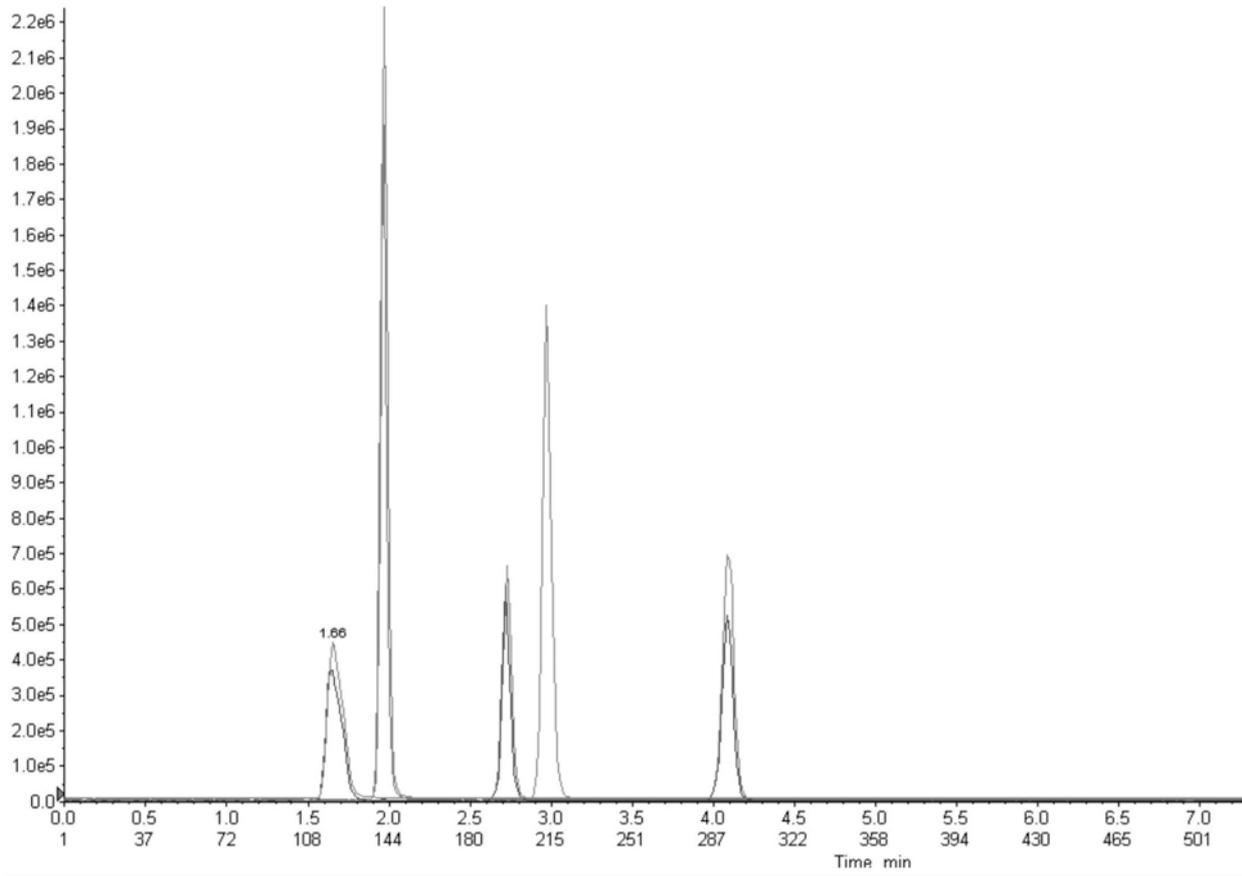


图4

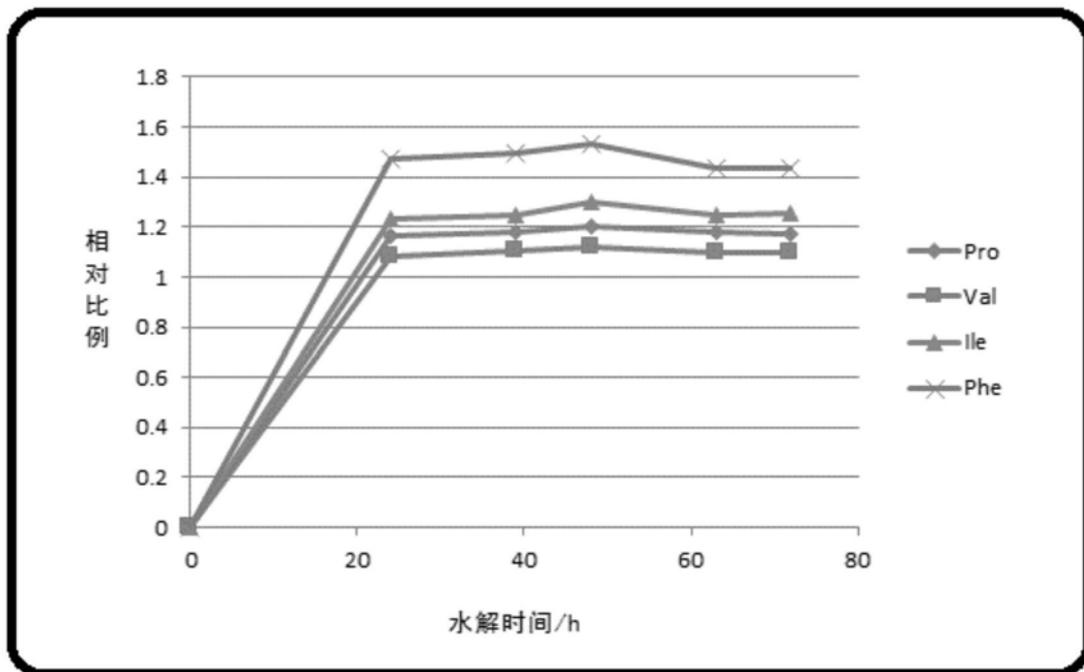


图5