



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110221078 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 201910482615.5

(22) 申请日 2019.06.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110221078 A

(43) 申请公布日 2019.09.10

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO.17083 2018.12.21
CGMCC NO.17084 2018.12.21

(73) 专利权人 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 刘卫晓 张哲 金芑军 高进
董美 王迪 苗朝华

(74) 专利代理机构 北京知汇林知识产权代理事
务所(普通合伙) 11794

代理人 董涛

(51) Int.Cl.
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

审查员 刘彦宁

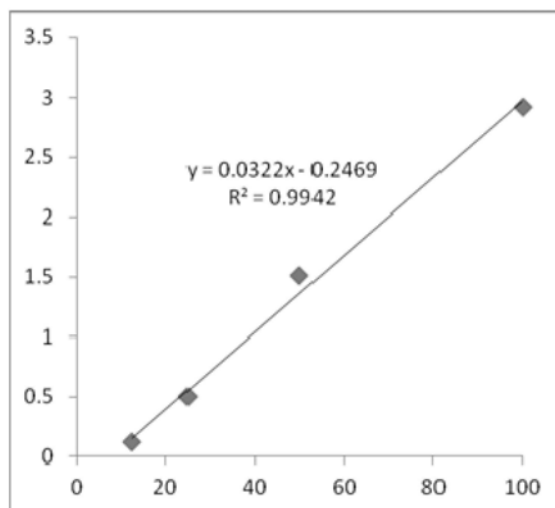
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种定量检测抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫
试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了属于生物工程技术领域的一种定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒及其检测方法,所述酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成,本发明试剂盒成本低,主要试剂均以工作液形式提供,操作简便,能同时快速检测大批样品;具有高灵敏度、高特异性的特点;是目前国内乃至国际首个能定量特异检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的试剂盒。



1. 一种定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成;其中,样品处理液为:1M Tris,pH 7.5 500uL,1M NaCl 1.5mL,0.5M EDTA 20uL,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50uL的1mM苯甲基磺酰氟;生物素标记的检测抗体为100μg/mL生物素标记的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6鼠单抗溶液;标准品为100ng的His-Bar重组蛋白;辣根过氧化物酶标记的亲合素为1:40辣根过氧化物酶标记的亲合素溶液;生物素标记的抗体稀释液以及辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液配方为1%BSA1g,0.05%的吐温20 0.05mL,0.1%的NaN₃ 0.1mL,最终用1×PBS定容至100mL;浓缩洗涤液为含有1.0%Tween-20的10×PBS;底物溶液为0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液,10mL底物缓冲液,32μL 30%H₂O₂混合,现用现配;终止液为1M H₂SO₄;所述的捕获抗体由保藏号为CGMCC No.17084的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2分泌得到的,捕获抗体的检测范围1.5625ng/mL-100ng/mL;所述检测抗体由保藏号为CGMCC No.17083的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6分泌得到。

2. 根据权利要求1所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述His-Bar重组蛋白是通过将Bar编码基因进行扩增、测序,鉴定正确以后与pET28a质粒连接,将重组表达载体pET28a-Bar转化大肠杆菌BL21感受态细胞,保存的重组蛋白Bar表达菌株复苏培养,用IPTG于16℃过夜诱导表达蛋白,并通过重组蛋白纯化得到。

3. 根据权利要求1所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2和Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6是用原核表达的重组蛋白Bar免疫BALB/c小鼠,然后用免疫后的小鼠脾细胞与商品化的小鼠杂交瘤细胞SP2/0融合,用HAT培养基筛选得到。

4. 权利要求1-3任一项所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:1)将权利要求1所述的样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液置于18-25℃,平衡至少30分钟;2)分别设标准品孔、待测样本孔,在对应孔中加入标准品和待测样本进行温育,然后弃去液体,甩干;每孔加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育,弃去孔内液体,甩干,洗板,甩干;每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液,进行温育,弃去孔内液体,甩干,洗板,甩干;每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值;3)数据处理:将标准品及样本值减去S₀孔数值后绘制曲线,如果设置复孔,则取其平均值计算,以标准品的浓度为纵坐标,OD值为横坐标,绘出标准曲线,根据样本OD值,由标准曲线查出相应的浓度。

5. 根据权利要求4所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述生物素标记的检测抗体工作液是通过将生物素标记的检测抗体用生物素标记的抗体稀释液按1:100倍进行稀释得到的;所述辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液是通过将辣根过氧化物酶标记的亲合素用辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液按1:100倍进行稀释得到的。

6. 根据权利要求4所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤2)中,每孔加标准品或待测样本80-120 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育1.5-2.5小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液80-120 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板2-4次,每次浸泡1-3分钟,150-250 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液80-120 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板4-6次,每次浸泡1-3分钟,150-250 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50 μ L,终止反应。

7. 根据权利要求4所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述步骤2)中,每孔加标准品或待测样本100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L,终止反应。

8. 权利要求1-3任一项所述定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法,其特征在于,所述检测方法为ELISA双抗体夹心方法。

一种定量检测抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,具体涉及一种定量检测抗除草剂蛋白Bar 的酶联免疫试剂盒。

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。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种定量检测抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒,该酶联免疫试剂盒可以定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar。

[0006] 本发明提供的定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成。

[0007] 其中,样品处理液的配方为:

[0008]	成分	用量
	1M Tris,pH 7.5	500uL
	1M NaCL	1.5mL
	0.5M EDTA	20uL
	50%glycerol	2mL
	10%SDS	1mL
	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50uL

[0009] 生物素标记的检测抗体:100μg/mL生物素标记的Bar单抗杂交瘤细胞株 PA1-

18030030/1B8 3D6鼠单抗 (PBS, 50% 甘油) 溶液;

[0010] 标准品: 100ng的His-Bar重组蛋白 (冻干粉), 所述His-Bar重组蛋白是通过将Bar编码基因进行扩增、测序, 鉴定正确以后与pET28a质粒连接, 将重组表达载体pET28a-Bar转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞, 保存的重组蛋白Bar表达菌株复苏培养, 用IPTG于16℃过夜诱导表达蛋白, 并通过重组蛋白纯化得到;

[0011] 辣根过氧化物酶标记的亲合素: 1:40辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase) 标记的亲合素 (avidin) 母溶液 (金开瑞公司), 工作液以1:100 倍稀释;

[0012] 生物素标记的抗体稀释液/辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液配方:

[0013]	稀释液 (100mL)	成分	用量
		0. 1%的 NaN_3	0. 1mL
		1%BSA	1g
		0. 05%的吐温 20	0. 05mL
		1×PBS	定容至 100mL

[0014] 浓缩洗涤液: 含有1.0% Tween-20的10×PBS;

[0015] 底物溶液: 0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液, 10mL底物缓冲液, 32μL 30% H_2O_2 混合, 现用现配;

[0016] 终止液: 1M H_2SO_4 。

[0017] 上述酶联免疫试剂盒在另一种实施方式中, 所述的捕获抗体由保藏号为 CGMCC No.17084的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2分泌得到的, Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2作为捕获抗体的检测范围为 1.5625ng/mL-100ng/mL。

[0018] 上述酶联免疫试剂盒在另一种实施方式中, 所述检测抗体由保藏号为 CGMCC No.17083的Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6分泌得到。

[0019] 所述Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/6F5 1D2和Bar单抗杂交瘤细胞株PA1-18030030/1B8 3D6是用原核表达的重组蛋白Bar免疫BALB/c小鼠, 然后用免疫后的小鼠脾细胞与商品化的小鼠杂交瘤细胞SP2/0融合, 用HAT培养基筛选得到。

[0020] 本发明还提供了一种定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的酶联免疫试剂盒的检测方法, 包括以下步骤:

[0021] 1) 将上述样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液置于18-25℃, 平衡至少30分钟;

[0022] 2) 分别设标准品孔、待测样本孔, 在对应孔中加入标准品和待测样本进行温育, 然后弃去液体, 甩干; 每孔加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板, 甩干; 每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液, 进行温育, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板, 甩干; 每孔加入底物溶液, 避光显色后每孔加入终止溶液, 在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值;

[0023] 3) 数据处理:将标准品及样本值减去S0孔数值后绘制曲线,如果设置复孔,则取其平均值计算,以标准品的浓度为纵坐标,OD值为横坐标,在对数坐标纸上绘出标准曲线,根据样本OD值,由标准曲线查出相应的浓度。

[0024] 上述检测方法在另一种实施方式中,生物素标记的检测抗体工作液是通过将生物素标记的检测抗体用生物素标记的抗体稀释液按1:100倍进行稀释得到的,如10 μ L生物素标记抗体加990 μ L生物素标记抗体稀释液,轻轻混匀,在临用前10分钟内配妥。

[0025] 上述洗板用的洗液工作液配置方法:将浓缩洗涤液按1:25倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取240mL去离子水,倒入浓烧杯或其他洁净容器中,再量取10mL浓洗涤液,均匀加入,搅拌混匀,在临用前配妥。浓缩洗涤液低温保存会有盐析出,稀释时可在水浴中加温助溶。

[0026] 上述检测方法在另一种实施方式中,辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液是通过将辣根过氧化物酶标记的亲合素用辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液按1:100倍进行稀释得到的,如10 μ L辣根过氧化物酶标记亲合素加990 μ L 辣根过氧化物酶标记亲合素稀释液,轻轻混匀,在临用前10分钟内配妥。

[0027] 上述检测方法在另一种实施方式中,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本80-120 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育1.5-2.5小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液80-120 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板2-4次,每次浸泡1-3分钟,150-250 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液80-120 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板4-6次,每次浸泡1-3分钟,150-250 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液80-100 μ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50 μ L,终止反应。

[0028] 上述检测方法在另一种实施方式中,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L。

[0029] 上述检测方法在另一种实施方式中,所述检测方法为ELISA双抗体夹心方法。

[0030] 本发明涉及的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。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:本发明试剂盒成本低,主要试剂均以工作液形式提供,操作简便,能同时快速检测大批样品;本试剂盒灵敏度高达0.33ng/mL、精密度批内差CV%<8%、批间差CV%<10%,特异性强、与其他相关蛋白无交叉反应。本发明是目前国内乃至国际首个能定量特异检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar的试剂盒。

附图说明

[0032] 图1是根据本发明的酶联免疫检测方法建立的标准曲线图。

具体实施方式

[0033] 下面结合附图和实施例对本发明作详细描述,但本发明的实施不仅限于此。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 实施例1定量检测转基因水稻中抗除草剂蛋白Bar

[0037] 将标准品从100ng稀释成系列浓度标准品,按照本申请所述的检测方法在每孔中加入标准品100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L,避光显色后每孔加入终止溶液,在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值做标准曲线,详见附图1,标准曲线的 $R^2 > 0.99$,线性检测范围1.5625ng/mL-100ng/mL,推出样品浓度计算公式: $x = (y + 0.2469) / 0.0322$ 。

[0038] 取转基因水稻叶片,经液氮研磨,与样本提取液充分混匀,冰上静止30min 后取上清,适当稀释后,每孔加待测样本100 μ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液100 μ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200 μ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 μ L,在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值,计算出转基因水稻叶片中,Bar的含量 $x = 131.17 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ 。

[0039] 操作注意事项:

[0040] 1、为保证检测结果的准确性,标准品及样本均设双孔测定,每次检测均需做标准曲线。

[0041] 2、如标本中待测物质含量过高,先用样本稀释液进行稀释,以使样本符合试剂盒的检测范围,最后计算时再乘以相应的稀释倍数。

[0042] 3、加样:加样时,使用一次性的洁净吸头,避免交叉污染。加样时尽量轻缓,避免起泡,将样本加于酶标板孔底部,切勿沿孔壁加样。一次加样时间最好控制在10分钟内,如标本数量多,推荐使用排枪加样。

[0043] 4、温育:为防止样本蒸发或污染,温育过程中酶标板必须覆上板贴,实验过程中酶标板应避免处于干燥的状态。温育过程中应随时观察温箱温度是否恒定于37 $^{\circ}$ C,及时调整。温育过程中,温箱不易开启太多次,以免影响温度平衡。

[0044] 5、洗涤:洗涤过程非常重要,不充分的洗涤易造成假阳性。

[0045] (1) 手工洗板方法:吸去(不可触及孔壁和孔底)或甩掉酶标板内的液体;在实验台上铺垫几层吸水纸,酶标板朝下用力拍几次;将推荐的洗涤缓冲液按200 μ L/孔注入孔内,浸泡2分钟。根据操作步骤中所述,重复此过程数次。

[0046] (2) 自动洗板:如果有自动洗板机,应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

[0047] 6、显色:为保证实验结果的准确性,底物反应时间到后尽快加入终止液。在加入底

物溶液后每隔一段时间观察一下显色情况以控制反应时间(比如每隔 10分钟)。当肉眼可见标准品前3-4孔有明显梯度蓝色,后3-4孔显色不明显时,即可加入终止液终止反应,此时蓝色立刻变为黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

[0048] 7、底物溶液应为浅蓝色或无色,如果颜色严重变深则必须弃用。底物溶液易受污染,请避光妥善保存。

[0049] 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。

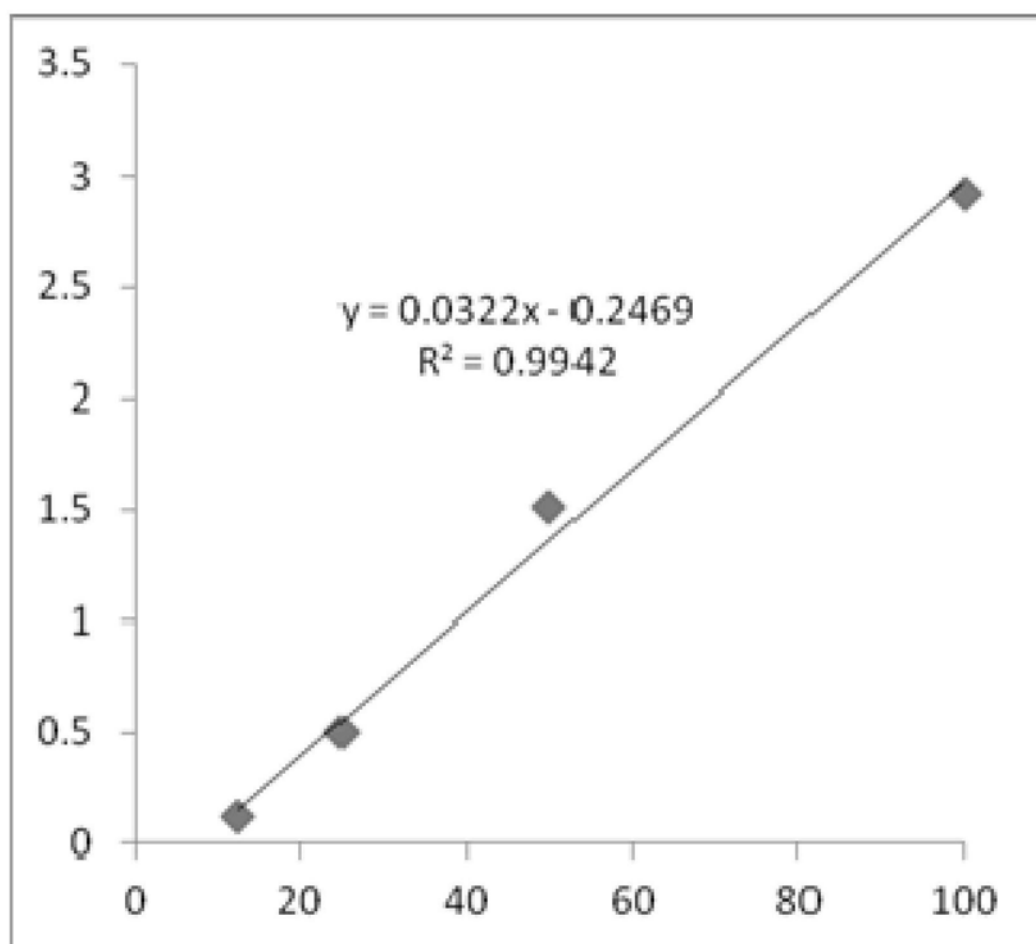


图1