

1. 一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球,其特征在于:免疫胶乳微球由抗 CpTI 蛋白多克隆抗体包被,微球颗粒大小为 200nm,最低检测限为 CpTI 融合蛋白 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,相关系数 $R^2=0.67$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球,其特征在于,所述免疫胶乳微球是单分散羧基化聚苯乙烯微球,颗粒大小为 200nm,表面载基团为羧基。

3. 一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 设计全长 CpTI 基因序列,根据原核细胞表达的优先密码子重新修饰并采用全基因合成技术构建全长 CpTI 基因表达序列;

2) 将步骤 1) 得到的 CpTI 基因片段通过限制酶切割插入谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体中,构建细菌融合表达载体;

3) 通过步骤 2) 对表达载体进行细菌表达后,利用亲和层析柱纯化获得 GST-CpTI 融合蛋白;

4) 将经过步骤 3) 得到的 GST-CpTI 融合蛋白抗原溶合弗氏佐剂后免疫小鼠,经分离纯化得到鼠抗 CpTI 多克隆抗体;

5) 将经过步骤 4) 得到的鼠抗 CpTI 多克隆抗体通过羧基-氨基化学偶联法偶联活化微球,得到检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球。

4. 根据权利要求 3 所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法,其特征在于,在步骤 2) 中:所述谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体是 pGEX-4T-2,构建完成后的融合表达载体是 pGEX-4T-2-CpTI。

5. 根据权利要求 3 所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法,其特征在于,在步骤 3) 中:所述亲和层析柱为谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B。

6. 根据权利要求 3-5 任一项所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法,其特征在于,在步骤 5) 中:所述免疫胶乳微球是单分散羧基化聚苯乙烯微球,颗粒大小为 200nm,表面载基团为羧基;所述免疫胶乳微球的活化是首先用碳化二亚胺活化微球,然后加入 N-羟基琥珀酰亚胺使微球形成稳定的活泼酯中间体,以备连接抗体分子之用。

检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球及其制备方法

[0001]

技术领域

[0002] 本发明涉及生物技术领域,尤其涉及一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球及其制备方法。

背景技术

[0003] 蛋白酶抑制剂广泛存在于植物体内,尤其在植物的贮藏器官内含量相当高。在植物体内蛋白酶抑制剂的生物学功能主要有两个方面:①通过与内源蛋白酶相互作用,调控组织细胞内的有关生理生化过程;②防止细胞、组织内的蛋白质成分被外源蛋白酶所降解。其更重要的作用在于作为一种抵御外界植食性昆虫和微生物攻击的化学防卫因子。研究证实,大多数植物来源的蛋白酶抑制剂对植物内源性蛋白酶没有抑制作用,但对外源蛋白酶有特异的抑制活性,这就为通过基因工程提高农作物防卫系统的效能提供了自然进化上的基础。

[0004] 豇豆胰蛋白酶抑制剂(cowpea trypsin inhibitor, CpTI)属丝氨酸蛋白酶抑制剂。与 Bt 毒蛋白相比,其杀虫机理完全不同且具有杀虫广谱,对人畜安全,昆虫不易产生抗性的优点而受到人们的重视。通过转基因技术将 CpTI 基因导入作物而获得的转基因植株已在我国部分地区得到了大规模的应用,但迄今对于转基因植物中豇豆胰蛋白酶抑制剂的检测方法不多,且检测灵敏度、检测限和抗干扰能力等亟待提高。目前,有关 CpTI 抑制剂免疫检测技术的研究报告和相关专利技术国内外报道很少,迫切需要开发高效、准确、快速的新型免疫检测技术和产品。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球及其制备方法,进一步填补 CpTI 抑制剂免疫检测技术的研发空白;取材简单、操作方便;制备方法细致严谨,重复性高;所制备的免疫胶乳微球颗粒小,粒径均匀,能检测 CpTI 融合蛋白最低限 $0.2 \mu\text{g/ml}$,其相关系数 $R^2=0.67$ 。

[0006] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现:

一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球,免疫微球由抗 CpTI 蛋白多克隆抗体包被,微球颗粒大小为 200nm,最低检测限为 CpTI 融合蛋白 $0.2 \mu\text{g/ml}$,相关系数 $R^2=0.67$ 。

[0007] 一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法,包括以下步骤:

1) 设计全长 CpTI 基因序列,根据原核细胞表达的优先密码子重新修饰并采用全基因合成技术构建全长 CpTI 基因表达序列;

2) 将步骤 1) 得到的 CpTI 基因片段通过限制酶切割插入谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体中,构建细菌融合表达载体;

3) 通过步骤 2) 对表达载体进行细菌表达后,利用亲和层析柱纯化获得 GST-CpTI 融合

蛋白；

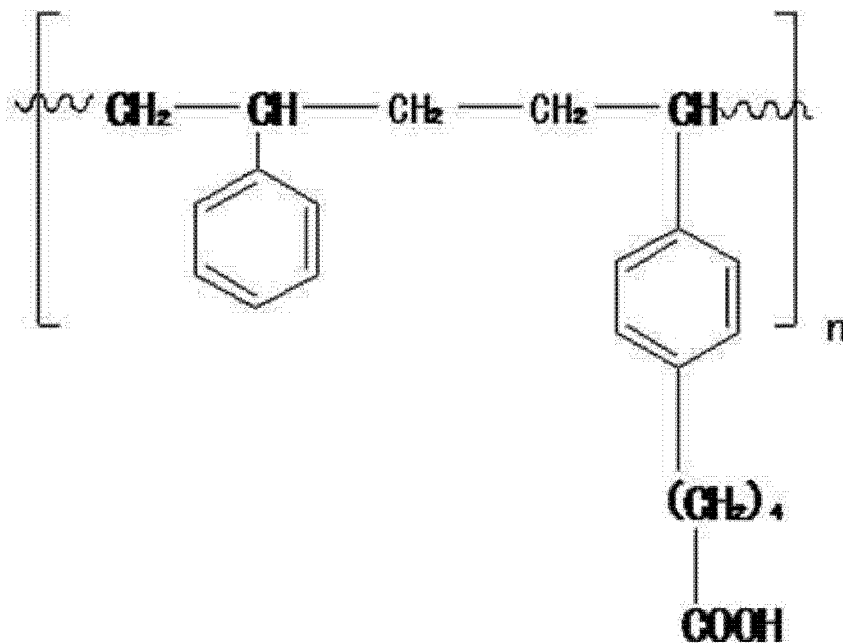
4) 将经过步骤 3) 得到的 GST-CpTI 融合蛋白抗原溶合弗氏佐剂后免疫小鼠, 经分离纯化得到鼠抗 CpTI 多克隆抗体；

5) 将经过步骤 4) 得到的鼠抗 CpTI 多克隆抗体通过羧基 - 氨基化学偶联法偶联活化微球, 得到检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球。

[0008] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中, 在步骤 2) 中的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体是 pGEX-4T-2, 构建完成后的融合表达载体是 pGEX-4T-2-CpTI。

[0009] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中, 在步骤 3) 中的亲和层析柱为谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathione Sepharose) 4B。

[0010] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中, 在步骤 5) 中采用单分散羧基化聚苯乙烯微球为基质材料, 羧基化聚苯乙烯微球大小 200nm, 表面载基团为羧基, 羧基化聚苯乙烯的分子式如下：



该微球的活化是首先用活化剂 EDC (碳化二亚胺) 活化微球, 然后加入保护剂 N- 羧基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS) 使微球形成稳定的活泼酯中间体, 以备连接抗体分子之用。

[0011] 本发明的有益效果为: 采用单分散羧基化聚苯乙烯微球为基质材料, 用化学偶联方法偶联抗 CpTI 多克隆抗体获得, 取材简单、操作方便; 制备方法细致严谨, 重复性高; 所制备的免疫胶乳微球颗粒小, 粒径均匀, 能检测 CpTI 融合蛋白最低限 0.2 $\mu\text{g/ml}$, 其相关系数 $R^2=0.67$ 。

附图说明

[0012] 下面根据附图对本发明作进一步详细说明。

[0013] 图 1 是本发明实施例所述的羧基化聚苯乙烯微球的扫描电镜图；

图 2 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中 CpTI 基因的原序列全长图谱；

图 3 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中经优化后的 CpTI 基因序列图谱；

图 4 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中菌落 PCR 验证 CpTI 基因插入片段电泳图谱；

图 5 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中质粒 Xba I 酶切电泳图谱；

图 6 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中 CpTI 表达载体的测序图谱；

图 7 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中 GST-CpTI 融合蛋白 SDS-PAGE 的检测图谱；

图 8 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中 GST-CpTI 融合蛋白 Western Blotting 的检测图谱；

图 9 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中抗血清效价测定图；

图 10 是本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中采用胶乳增强免疫比浊法检测 CpTI 融合蛋白结果图。

具体实施方式

[0014] 本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球, 免疫微球由抗 CpTI 蛋白多克隆抗体包被, 微球颗粒大小为 200nm (图 1), 最低检测限为 CpTI 融合蛋白 $0.2 \mu\text{g/ml}$, 相关系数 $R^2=0.67$ 。

[0015] 本发明实施例所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法, 包括以下步骤:

1) 设计全长 CpTI 基因序列, 根据原核细胞表达的优先密码子重新修饰并采用全基因合成技术构建全长 CpTI 基因表达序列;

2) 将步骤 1) 得到的 CpTI 基因片段通过限制酶切割插入谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体中, 构建细菌融合表达载体;

3) 通过步骤 2) 对表达载体进行细菌表达后, 利用亲和层析柱纯化获得 GST-CpTI 融合蛋白;

4) 将经过步骤 3) 得到的 GST-CpTI 融合蛋白抗原溶合弗氏佐剂后免疫小鼠, 经分离纯化得到鼠抗 CpTI 多克隆抗体;

5) 将经过步骤 4) 得到的鼠抗 CpTI 多克隆抗体通过羧基-氨基化学偶联法偶联活化微球, 得到检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球。

[0016] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中, 在步骤 2) 中的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体是 pGEX-4T-2, 构建完成后的融合表达载体是 pGEX-4T-2-CpTI。

[0017] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中, 在步骤 3)

中的亲和层析柱为谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathione Sepharose)4B。

[0018] 在上述所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法中,在步骤5)中的微球是单分散羧基化聚苯乙烯微球,大小 200nm,表面载基团为羧基;该微球的活化是首先用活化剂 EDC (碳化二亚胺)活化微球,然后加入保护剂 N- 羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)使微球形成稳定的活泼酯中间体,以备连接抗体分子之用。

[0019] 实例

本发明在具体实施时,包括以下步骤:

1) 构建全长 CpTI 基因表达序列:

(a) 设计全长 CpTI 基因序列,结果如图 2 所示;

(b) 根据原核细胞表达的优先密码子重新修饰,采用全基因合成技术构建全长 CpTI 基因,共 333 对碱基,克隆至载体 pGEM-T Easy,结果如图 3 所示;

(c) 通过菌落 PCR 验证 CpTI 基因片断插入的正确性,结果如图 4 所示;

(d) 将克隆 CpTI 基因菌实施扩增培养,提取质粒后进行酶切和琼脂糖电泳分析,结果如图 5 所示;

(e) DNA 测序,保证基因的全部序列 100% 准确,结果如图 6 所示。

[0020] 2) 表达和纯化提取 GST-CpTI 融合蛋白:

(a) 将 CpTI 基因片段通过限制酶切割插入 pGEX-4T-2 载体中,构建细菌融合表达载体 pGEX-4T-2-CpTI;

(b) 将融合表达载体 pGEX-4T-2-CpTI 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)细胞,细胞生长条件为 230 转/分,温度 37° C;

(c) 当菌体生长 OD₅₉₅ 值为 0.5-0.8 时,加入 1.0mM 的诱导剂 IPTG,在 25° C 诱导 3 小时;在 4° C 时,以 5,000× g 离心 5 分钟,收集菌体;

(d) 菌体经 PBS 缓冲液清洗 3 次后,超声破碎;破碎细胞在 4° C 时,以 14,000' g 离心 1 小时,收集上清;

(e) 将上清循环通过谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathione Sepharose)4B 亲和层析柱,4° C 过夜;未结合蛋白用 10 倍床体积的 1× PBS 冲洗;

(f) 将结合的 GST-CpTI 融合蛋白用洗脱液洗脱并收集、保存;并对表达和纯化提取的 GST-CpTI 融合蛋白做 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析,结果如图 7 和 8 所示。

[0021] 3) 制备抗 CpTI 多克隆抗体:

(a) 将 GST-CpTI 融合蛋白抗原与弗氏佐剂混合后,充分乳化;采用背部多点注射法免疫 BALB/c 小鼠;每次免疫的抗原量约 10 μg,免疫三次;每次免疫两周后经尾动脉取血检测抗体效价;

(b) 以适宜浓度的抗原包被酶标板,100 μl/孔,4° C 过夜;

(c) 洗涤后,加入待检的血清样品,100 μl/孔,37° C 1 小时;设阴性对照孔;

(d) 洗涤后,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体试剂,100 μl/孔,37° C 避光显色 15 分钟;用 2M H₂SO₄ 终止反应后,阅读各孔的 A490 值;并对制备的抗 GST-CpTI 融合蛋白抗体,经 ELISA 法检测,抗体能与 GST-CpTI,GST 蛋白特异性结合,其相关系数达到显著水平,效价 >1:8000,结果如图 9 所示。

[0022] 4) 制备用于检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球:

(a) 将单分散羧基化聚苯乙烯微球用活化剂 EDC (碳化二亚胺) 活化, 然后加入保护剂 N- 羟基琥珀酰亚胺 (Sulfo-NHS) 使微球形成稳定的活泼酯中间体;

(b) 加入抗 CpTI 蛋白多克隆抗体, 温育 1-2 小时;

(c) 洗涤后, 收集免疫微球;

(d) 通过 CA-1680 型生化分析仪, 采用胶乳增强免疫比浊法, 检测 CpTI 融合蛋白样品。

[0023] 采用本发明所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球的制备方法, 制备出的免疫胶乳微球经生化分析仪检测, 用于检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球最低检测限为 CpTI 融合蛋白 $0.2 \mu\text{g/ml}$, 其相关系数 $R^2=0.67$, 结果如图 10 所示。由此可见, 本发明所制备的用于检测 CpTI 蛋白的免疫胶乳微球检测灵敏度较高, 且操作简单、重复性强, 显示了良好的应用前景。

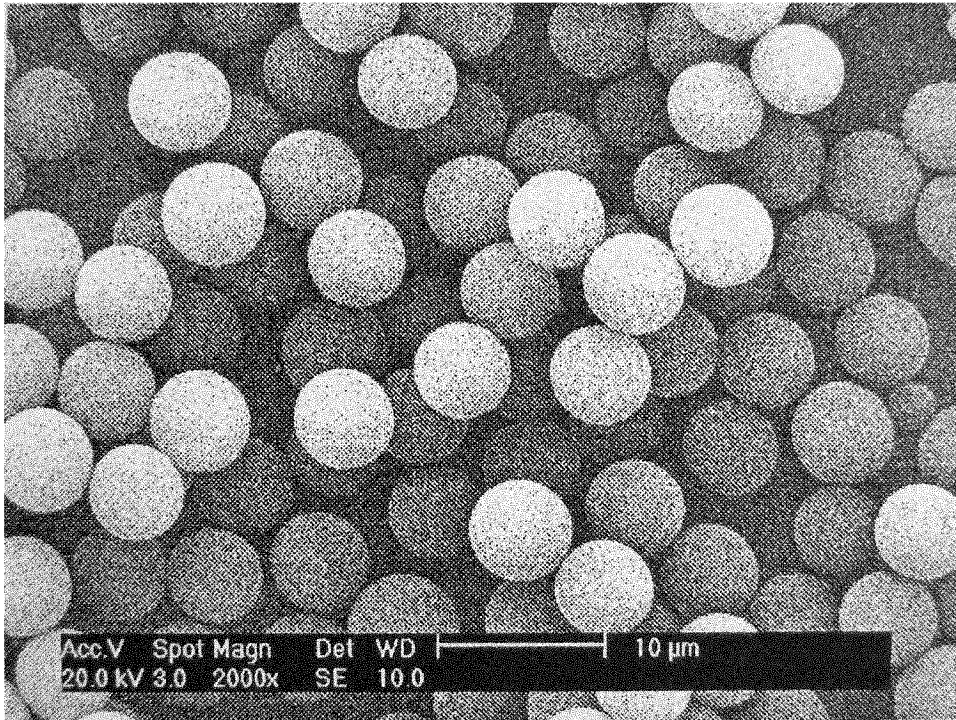


图 1

Total amino acid number: 107, MW=11707
Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 1) for 107 AA(321 bases), MW=11707

```
1      ATGATGGTGCTAAAGGTGTGTGTGCTGGTACTTTTCCTGTAGGGGTACTACTGCAGCC
1      M N V L K V C V L V L F L V G V T T A A

61     ATGGATCTGRACCACCTCGGAAGTAATCATCATGATGACTCAGCGATGAACCTTCTGAG
21     M D L N H L G S N H H D D S S D E P S E

121    TCTTCAGAACCATGCTCCGATTCATGCATCTGCACATAATCAATACCTCCTCAATGCCAT
41     S S E P C C D S C I C T K S I P P Q C H

181    TGTACAGATATCAGGTTGAATTCATGTCACCTCGGCTTGCAATCCTGCATGTGTACAGCA
61     C T D I R L N S C H S A C K S C M C T R

241    TCAACGCCAGGCAGTGTGCTTGCCTTGACATTGCTGATTTCTGTTACAAACCTTGCAG
81     S T P G K C R C L D I A D F C Y K P C K

301    TCCAGGGATGAAGATGATGAGTAA
101    S R D E D D E *
```

图 2

Total amino acid number: 111, MW=12137
Max ORF starts at AA pos 1(may be DNA pos 3) for 111 AA(333 bases), MW=12137

```
1      CCAATGGGCATGATGGTGGCTGAAAGTGTGTGTGCTGGTGTCTGTTCCTGGTGGTGTACTA
1      M G M M V L K V C V L V L F L V G V T

61     CTGCCGCTATGGACCTGAATCACCTGGGTAGCAATCATCAGGATGACAGCTCCGATGAC
20     T A A M D L N H L G S N H H D D S S D E

121    CGTCAGAAAGCTCTGAACCTTGCTGTGACTCCTGTATCTGTACCAAAGCATTCCGCCAC
40     P S E S S E P C C D S C I C T K S I P P

181    AGTGCCATTGTACTGACATTCCGCTGAACTCATGCCATTCCGGCCTGTAAAAGTTGTATGT
60     Q C H C T D I R L N S C H S A C K S C M

241    GTACTCGCTCTACTCCGGGAAAATGCCGTTGTCTGGATATTGCCGACTTCTGCTATAAAC
80     C T R S T P G K C R C L D I A D F C Y K

301    CGTGIAAAAGCCGTGACGAAGATGACGAGCTCGAG
100    P C K S R D E D D E L
```

图 3

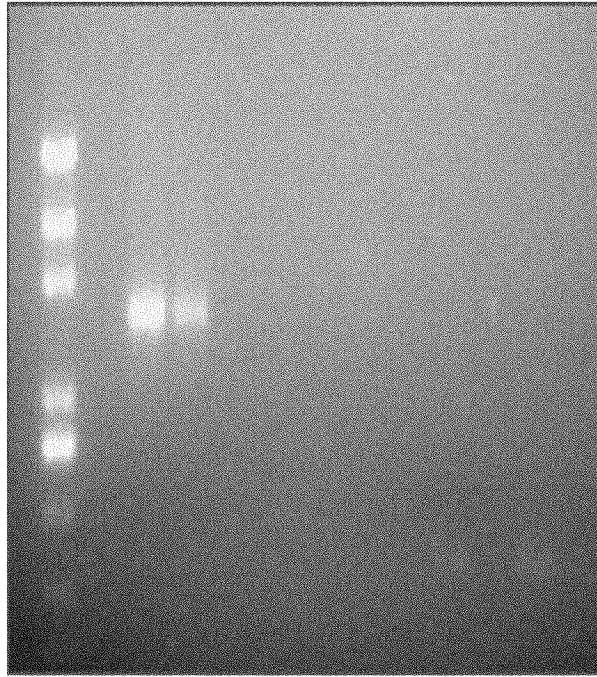


图 4

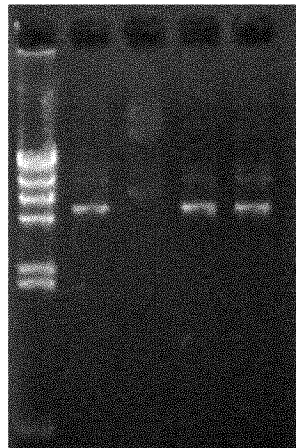


图 5

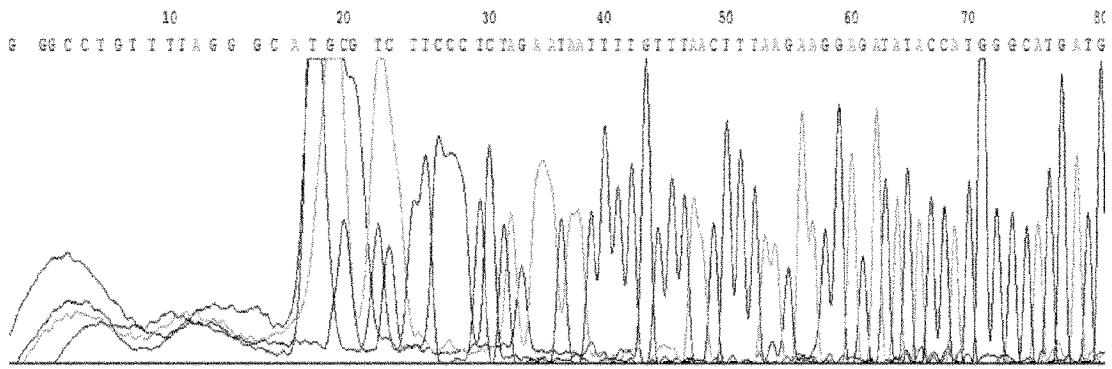


图 6

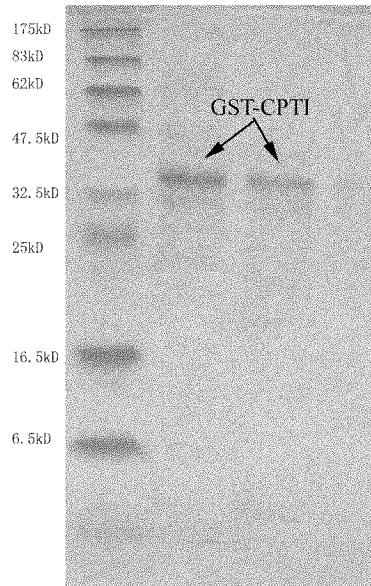


图 7

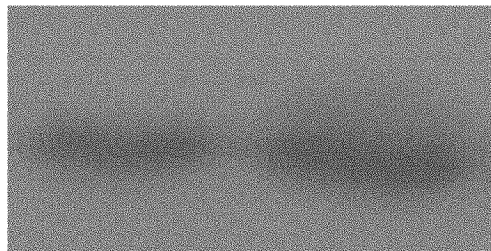


图 8

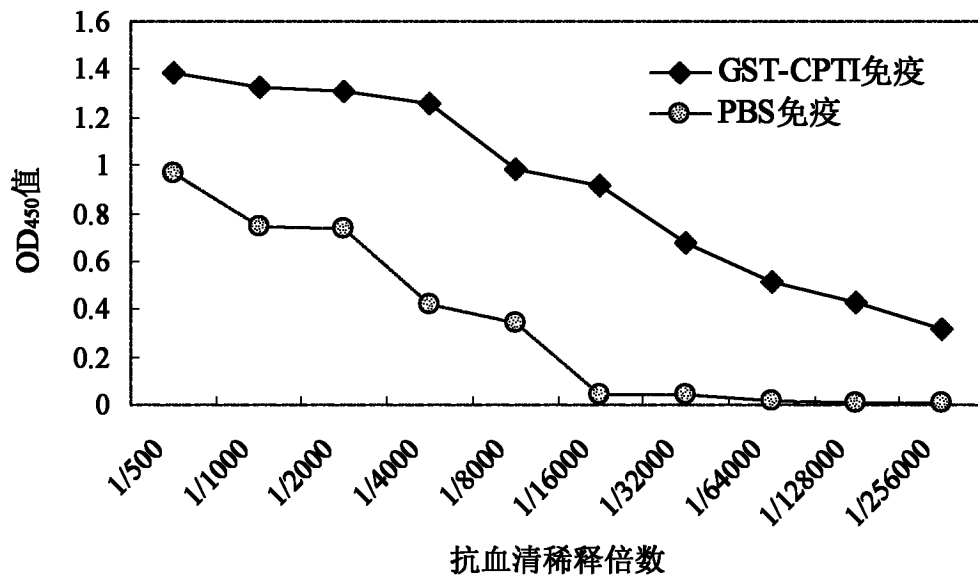


图 9

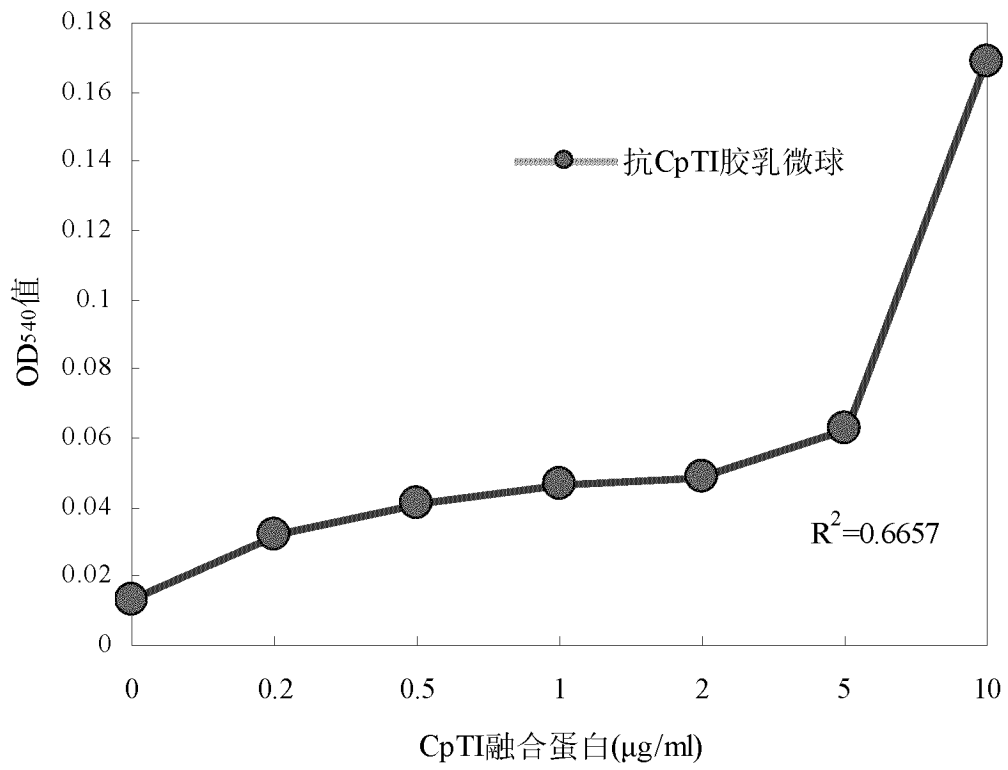


图 10

专利名称(译)	检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球及其制备方法		
公开(公告)号	CN102109521A	公开(公告)日	2011-06-29
申请号	CN201010591728.8	申请日	2010-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国环境科学院		
申请(专利权)人(译)	中国环境科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国环境科学研究院		
[标]发明人	肖能文 潘卫东 王学霞 李俊生		
发明人	肖能文 潘卫东 王学霞 李俊生		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/531 C07K17/08		
代理人(译)	王珂		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫胶乳微球及其制备方法，该免疫微球由抗CpTI蛋白多克隆抗体包被，微球颗粒大小200nm；所述免疫胶乳微球的制备方法包括以下步骤：设计全长CpTI基因序列；将CpTI基因片段通过限制酶切割插入谷胱甘肽-S-转移酶（GST）基因融合表达载体中，构建细菌融合表达载体；利用亲和层析柱纯化获得GST-CpTI融合蛋白；将GST-CpTI融合蛋白抗原溶合弗氏佐剂后免疫小鼠，经分离纯化得到鼠抗CpTI多克隆抗体；将抗体通过化学偶联法偶联活化后的微球，得到检测CpTI蛋白的免疫胶乳微球。本发明的有益效果为：灵敏度较高，且操作简单、重复性强；所制备的免疫胶乳微球颗粒小，粒径均匀，能检测CpTI融合蛋白最低限0.2μg/ml，其相关系数R2=0.67。

Total amino acid number: 111, MW=12137
 Max ORF starts at AA pos 1 (may be DNA pos 3) for 111 AA (333 bases), MW=12137

```

1   CCATGGGCATGATGGTCTGAAGTGTGTGCTGGTCTGTTCCTGGTGGTACTA
1   M G M N V L K V C V L V L F L V G V T
61   CTGCCCTATGGACCTGAATCACTGGGTAGCAATCATCAGATGACAGCTCCGATGAC
20   T A A M D L N H L G S N H H D D S S D E
121  CGTCAGAAAGCTTGAACCTTCTGTGACTCCCTGTATCTGTACCAAAAGCAITCCGAC
40   P S E S S E P C C D S C I C T K S I P P
181  AGTCCCAITGTACTGACATTCGCGTCACTCATGCCAATCGGCTGTAAAGTGTATGT
60   Q C H C T D I R L N S C H S A C K S C H
241  GTACTGCTCTACTCCGGAAATGCCGTGTCTGGATATTCGCACTTCTGCTATAAAC
80   C T R S T P G K C R C L D I A D F C Y K
301  CSIGTAAAGCCGTGACGAAGATGACGACTCGAG
100  F C K S R D E D D E L
  
```