



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102175876 A

(43) 申请公布日 2011.09.07

(21) 申请号 201110036243.7

(22) 申请日 2011.02.11

(71) 申请人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市玄武区卫岗1号

(72) 发明人 陈法军 潘卫东

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 徐冬涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

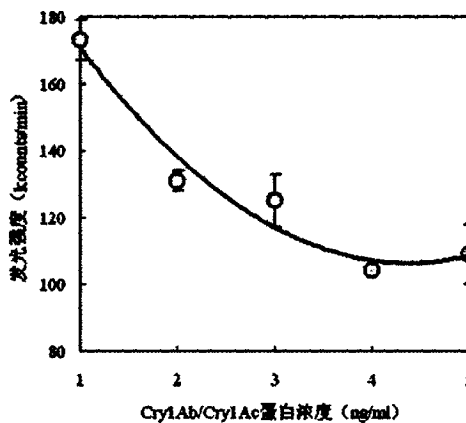
序列表 2 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法。本发明检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒，由抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体包被，磁颗粒大小 150 ~ 200nm。该免疫纳米磁颗粒是通过改进的化学沉淀法制备具有高度水溶性的羧基纳米磁颗粒，再将抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体通过化学偶联法偶联活化后的纳米磁颗粒而得到。使用该免疫纳米磁颗粒通过化学发光 EIA 法检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白样品，灵敏度较高，最大检测到的蛋白浓度是 1000ng/ml，最小检测浓度是 1ng/ml；而且易于磁富集而排除杂质分子干扰。



1. 一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于,该免疫纳米磁颗粒由抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体包被,磁颗粒大小 150 ~ 200nm,具体通过如下步骤制备:

(1) 将 0.85 ~ 1.5g 无水 FeCl₃ 和 0.6 ~ 1.2g FeCl₂ · 4H₂O 溶解于 100ml 超纯水中,加热搅拌至完全溶解;

(2) 在温度 80-85℃时,加入 15 ~ 20ml 2 ~ 5M NaOH 溶液于步骤 (1) 所得混合液中,反应 2 ~ 5min,加入 15 ~ 20ml 0.05 ~ 1.0M 的 PAA 溶液,继续加热搅拌 30min,得到水溶性羧基纳米磁颗粒;

(3) 将所述的水溶性羧基纳米磁颗粒在外加磁场作用下用无水乙醇洗涤 3 ~ 5 次,以超纯水分散保存;

(4) 将鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体,通过羧基-氨基化学偶联法偶联所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,得到检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

2. 根据权利要求 1 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于步骤 (2) 中所述的 PAA 溶液是分子量为 1800 ~ 2000 的短链聚丙烯酸溶液;步骤 (3) 中所述的外加磁场为恒流电磁场,磁感应强度为 30mT。

3. 根据权利要求 1 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于步骤 (4) 中所述的羧基-氨基化学偶联法是采用碳化二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺活化法偶联抗体:首先用 30mM、pH = 5 的 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液在外加磁场作用下清洗所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,使所述的水溶性羧基纳米磁颗粒分散于 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液中,终浓度为 40 ~ 60mg/ml;取所述的含水溶性羧基纳米磁颗粒的 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液 100 μl,依次加入 50mM 碳化二亚胺、50mM N-羟基丁二酰亚胺溶液各 50 ~ 100 μl,室温震荡 30 ~ 40min,在磁场作用下弃上清,用 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸溶液清洗 3 次,得已活化的纳米磁颗粒;取 1.09mg/ml 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体 100 ~ 200 μl,加入所述的已活化的纳米磁颗粒,室温震荡 30 ~ 40min,磁性分离,收集收集上清,用 0.02M、pH = 7.4 磷酸缓冲液多次洗涤,得到所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

4. 根据权利要求 1 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于步骤 (4) 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体为鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体是将 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白与弗氏佐剂混合后免疫小鼠,经分离纯化得到鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

6. 一种权利要求 1 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒的制备方法,其特征在于,该方法包含如下步骤:

(1) 将 0.85 ~ 1.5g 无水 FeCl₃ 和 0.6 ~ 1.2g FeCl₂ · 4H₂O 溶解于 100ml 超纯水中,加热搅拌至完全溶解;

(2) 在温度 80-85℃时,加入 15 ~ 20ml 2 ~ 5M NaOH 溶液于步骤 (1) 所得混合液中,反应 2 ~ 5min,加入 15 ~ 20ml 0.05 ~ 1.0M 的 PAA 溶液,继续加热搅拌 30min,得到水溶性羧基纳米磁颗粒;

(3) 将所述的水溶性羧基纳米磁颗粒在外加磁场作用下用无水乙醇洗涤 3 ~ 5 次,以超纯水分散保存;

(4) 将所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体,通过羧基-氨基化学偶联法偶联所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,得到检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

7. 按权利要求 5 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒的制备方法,其特征还在于,所述步骤 (2) 中的 PAA 溶液是分子量为 1800 ~ 2000 的短链聚丙烯酸溶液;所述步骤 (3) 中的外加磁场为恒流电磁场,磁感应强度为 30mT。

8. 按权利要求 6 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒的制备方法,其特征还在于步骤 (4) 中所述的羧基-氨基化学偶联法是采用碳化二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺活化法偶联抗体:首先用 30mM、pH = 5 的 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液在外加磁场作用下清洗所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,使所述的水溶性羧基纳米磁颗粒分散于 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液中,终浓度为 40 ~ 60mg/ml;取所述的含水溶性羧基纳米磁颗粒的 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液 100 μ l,依次加入 50mM 碳化二亚胺、50mM N-羟基丁二酰亚胺溶液各 50 ~ 100 μ l,室温震荡 30 ~ 40min,在磁场作用下弃上清,用 2-(N-吗啉)-乙烷磺酸溶液清洗 3 次,得已活化的纳米磁颗粒;取 1.09mg/ml 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体 100 ~ 200 μ l,加入所述的已活化的纳米磁颗粒,室温震荡 30 ~ 40min,磁性分离,收集收集上清,用 0.02M、pH = 7.4 磷酸缓冲液多次洗涤,得到所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

9. 根据权利要求 6 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于步骤 (4) 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体为鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

10. 根据权利要求 9 所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,其特征在于所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体是将 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白与弗氏佐剂混合后免疫小鼠,经分离纯化得到鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法。

背景技术

[0002] Bt 蛋白是由苏云金芽孢杆菌在芽孢形成过程中产生的伴孢晶体蛋白,其分子结构复杂,在伴孢晶体内是以毒素蛋白原的形式存在,在昆虫肠道内可被蛋白酶水解而被活化;活化的 Bt 毒蛋白可与昆虫肠道上皮细胞表面的特异受体相互作用,诱导并引起细胞膨胀甚至裂解,导致昆虫停止进食而最终死亡。通过转基因技术,将 Bt 毒蛋白基因引入农作物中,为控制害虫危害农业提供了新的思路。

[0003] 目前应用最广的主要是 Cry 类 Bt 毒蛋白,转 Cry 类 Bt 抗虫基因棉花、玉米和马铃薯等都已经进入了商业化生产。对于转基因植物,在实际大田生产过程中,抗虫性的强弱与植物体内的杀虫蛋白含量直接相关,亦即与基因在植物体内的表达水平直接相关,因此准确地定量出植物器官、组织中毒蛋白的含量,对于指导抗虫作物生产具有特别重要的意义。杀虫蛋白在转基因植物中的含量极低,仅占植物组织中可溶性蛋白含量的 0.001% -0.3%,但迄今对于转基因植物中 Bt 杀虫蛋白的检测方法不多,且检测灵敏度、检测限和抗干扰能力等亟待提高。目前,有关 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白免疫检测技术的研究报告和相关专业国内外报道很少,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

[0004] 本发明的目的在于:进一步填补 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白免疫检测技术的研发空白,提供一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

[0005] 本发明的另一目的是提高该免疫纳米磁颗粒的制备方法。

[0006] 本发明的目的是这样实现的:一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒,该免疫纳米磁颗粒由抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体包被,磁颗粒大小 150 ~ 200nm,具体通过如下步骤制备:

[0007] (1) 将 0.85 ~ 1.5g 无水 FeCl_3 和 0.6 ~ 1.2g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100ml 超纯水中,加热搅拌至完全溶解;

[0008] (2) 在温度 80-85°C 时,加入 15 ~ 20ml 2 ~ 5M NaOH 溶液于步骤 (1) 所得混合液中,反应 2 ~ 5min,加入 15 ~ 20ml 0.05 ~ 1.0M 的 PAA 溶液,继续加热搅拌 30min,得到水溶性羧基纳米磁颗粒;

[0009] (3) 将所述的水溶性羧基纳米磁颗粒在外加磁场作用下用无水乙醇洗涤 3 ~ 5 次,以超纯水分散保存;

[0010] (4) 将鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体,通过羧基-氨基化学偶联法偶联所述的

水溶性羧基纳米磁颗粒,得到检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

[0011] 其中,步骤(2)中所述的PAA溶液是分子量为1800~2000的短链聚丙烯酸溶液。短链聚丙烯酸可以作为表面修饰剂和活性剂,其链上的羧基团结合于 Fe_3O_4 纳米磁颗粒表面,具有疏水性质的羧基使纳米磁颗粒稳定分散于水性溶剂。

[0012] 步骤(3)中所述的外加磁场为恒流电磁场,磁感应强度为30mT。

[0013] 步骤(4)中所述的羧基-氨基化学偶联法是采用碳化二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺活化法偶联抗体:首先用30mM、pH=5的2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液在外加磁场作用下清洗所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,使所述的水溶性羧基纳米磁颗粒分散于2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液中,终浓度为40~60mg/ml;取所述的含水溶性羧基纳米磁颗粒的2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液100 μ l,依次加入50mM碳化二亚胺、50mM N-羟基丁二酰亚胺溶液各50~100 μ l,室温震荡30~40min,在磁场作用下弃上清,用2-(N-吗啉)-乙烷磺酸溶液清洗3次,得已活化的纳米磁颗粒;取1.09mg/ml所述的鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白多克隆抗体100~200 μ l,加入所述的已活化的纳米磁颗粒,室温震荡30~40min,磁性分离,收集收集上清,用0.02M、pH=7.4磷酸缓冲液多次洗涤,得到所述的检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

[0014] 步骤(4)所述的鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白抗体优选鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白多克隆抗体。

[0015] 所述的鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白多克隆抗体是将Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白与弗氏佐剂混合后免疫小鼠,经分离纯化得到鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白多克隆抗体。

[0016] 一种检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒的制备方法,包含如下步骤:

[0017] (1) 将0.85~1.5g无水 $FeCl_3$ 和0.6~1.2g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶解于100ml超纯水中,加热搅拌至完全溶解;

[0018] (2) 在温度80~85 $^{\circ}C$ 时,加入15~20ml 2~5M NaOH溶液于步骤(1)所得混合液中,反应2~5min,加入15~20ml 0.05~1.0M的PAA溶液,继续加热搅拌30min,得到水溶性羧基纳米磁颗粒;

[0019] (3) 将所述的水溶性羧基纳米磁颗粒在外加磁场作用下用无水乙醇洗涤3~5次,以超纯水分散保存;

[0020] (4) 将鼠抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白抗体,通过羧基-氨基化学偶联法偶联所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,得到检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

[0021] 其中,步骤(2)中所述的PAA溶液是分子量为1800~2000的短链聚丙烯酸溶液。短链聚丙烯酸可以作为表面修饰剂和活性剂,其链上的羧基团结合于 Fe_3O_4 纳米磁颗粒表面,具有疏水性质的羧基使纳米磁颗粒稳定分散于水性溶剂。

[0022] 步骤(3)中所述的外加磁场为恒流电磁场,磁感应强度为30mT。

[0023] 步骤(4)中所述的羧基-氨基化学偶联法是采用碳化二亚胺、N-羟基丁二酰亚胺活化法偶联抗体:首先用30mM、pH=5的2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液在外加磁场作用下清洗所述的水溶性羧基纳米磁颗粒,使所述的水溶性羧基纳米磁颗粒分散于2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液中,终浓度为40~60mg/ml;取所述的含水溶性羧基纳米磁颗粒的2-(N-吗啉)-乙烷磺酸缓冲液100 μ l,依次加入50mM碳化二亚胺、50mM N-羟基丁二酰亚

胺溶液各 50 ~ 100 μ l, 室温震荡 30 ~ 40min, 在磁场作用下弃上清, 用 2-(N- 吗啉)- 乙烷磺酸溶液清洗 3 次, 得已活化的纳米磁颗粒; 取 1.09mg/ml 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体 100 ~ 200 μ l, 加入所述的已活化的纳米磁颗粒, 室温震荡 30 ~ 40min, 磁性分离, 收集收集上清, 用 0.02M、pH = 7.4 磷酸缓冲液多次洗涤, 得到所述的检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。

[0024] 步骤 (4) 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体为鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

[0025] 所述的鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体是将 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白与弗氏佐剂混合后免疫小鼠, 经分离纯化得到鼠抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体。

[0026] 本发明的有益效果: 本发明采用水溶性羧基化纳米 Fe_3O_4 磁颗粒为基质材料, 用化学偶联方法偶联抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体, 首次制备成功了检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒。该制备方法取材简单、操作方便、重复性高; 所制备的免疫纳米磁颗粒粒径小, 品相均匀, 使用该免疫纳米磁颗粒通过化学发光 EIA 法检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白样品, 灵敏度较高, 最大检测到的蛋白浓度是 1000ng/ml, 最小检测浓度是 1ng/ml; 而且易于磁富集而排除杂质分子干扰。

附图说明

[0027] 图 1 水溶性羧基纳米磁颗粒 JEOL 扫描电镜照片。

[0028] 图 2 水溶性羧基纳米磁颗粒的 FTIR 光谱分析 (红色示对照)。

[0029] 图 3 水溶性羧基纳米磁颗粒的磁滞回线 (红色示对照)。

[0030] 图 4 水溶性羧基纳米磁颗粒的 X 射线衍射分析 (红色示对照)。

[0031] 图 5 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体 Western Blotting 检测分析。

[0032] 图 6 抗血清效价测定。

[0033] 图 7 免疫纳米磁颗粒化学发光 EIA 法检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白。

具体实施方式

[0034] 实施例 1 水溶性羧基纳米磁颗粒的制备

[0035] 1、将 0.85g 无水 $FeCl_3$ 和 0.6g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 溶解于 100ml 超纯水中, 加热搅拌至完全溶解, 此时溶液呈透明黄色;

[0036] 2、以乙二醇为溶剂配制 0.05M 的 PAA 溶液并配制 5M 的 NaOH 水溶液。当温度维持在 80 ~ 85 $^{\circ}C$ 时, 加入 15ml 5M 的 NaOH 溶液于步骤 1 所得混合液中, 溶液颜色变黑, 待反应 2min 后, 加入 20ml 0.05M 的 PAA 溶液, 继续加热搅拌 30min, 得到水溶性羧基纳米磁颗粒。整个实验过程在恒温水浴和氮气保护下进行;

[0037] 3、将上述水溶性羧基纳米磁颗粒在外加磁场作用下 (恒流电磁场, 磁感应强度为 30mT) 用无水乙醇洗涤 3 次, 以超纯水分散保存;

[0038] 4、制备完成的水溶性羧基纳米磁颗粒形态和大小, 结果如图 1 所示。

[0039] 通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 对制备完成的水溶性羧基纳米磁颗粒进行表征, 具体的操作步骤如下:

[0040] 1) 将制备好的水溶性羧基纳米磁颗粒冷冻干燥后, 加入 KBr 压片;

[0041] 2) 以相同方法处理作为对照的 Fe_3O_4 粉末；

[0042] 3) 通过傅里叶红外变换光谱仪 (FTIR-8400 型), 记录波数在 $0-4000\text{cm}^{-1}$ 范围内的傅里叶变换红外光谱 (FTIR), 结果如图 2 所示。

[0043] 通过振动样品磁强计 (Model 4HF 型) 检测制备完成的水溶性羧基纳米磁颗粒的磁性 (磁滞回线), 磁场强度范围为 $-6000 \sim 60000\text{e}$, 结果如图 3 所示。

[0044] 通过 R-AXIS SPIDER 衍射仪记录制备完成的水溶性羧基纳米磁颗粒衍射图谱, 具体的操作步骤如下:

[0045] 1) 采用 R-AXIS SPIDER 衍射仪, 靶面为 Mo 和 Cu, $\lambda = 1.79025 \times 10^{-10}\text{m}$, 入射狭缝 1° , 接受狭缝为 0.6° , 防散射狭缝 1° , 管压为 32.5kV, 管流 30mA;

[0046] 2) 将纳米磁颗粒取适量装到特制玻璃样品板上, 压实后放入衍射仪中;

[0047] 3) 启动衍射仪, 开始自动扫描记录样品衍射图谱, 结果如图 4 所示。

[0048] 由图 1 所示, 制备的水溶性羧基纳米磁颗粒直径约 150nm, 分散性良好; 由图 2 磁滞回线显示, 样品的矫顽力较小, 磁滞不明显, 表现出良好的超顺磁性; 由图 3X 射线衍射分析所示, 样品以 Fe_3O_4 为主, 衍射峰比较尖锐, 说明颗粒结晶性能良好; 由图 4 傅里叶变换红外光谱检测所示, PAA 的 FTIR 中 1710cm^{-1} 处显示出特征吸收峰, 表明 PAA 已成功修饰于纳米磁颗粒表面。综合上述检测结果显示, 制备的水溶性羧基纳米磁颗粒性能良好, 满足目的需要。

[0049] 实施例 2 抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白多克隆抗体的制备

[0050] 1、根据 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白 (SEQ ID NO. 1) 和基因 (SEQ ID NO. 2) 的一致序列, 采用全基因合成技术构建 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白基因, 共 660 对碱基, 克隆至融合表达载体 pGEX-4T-2 (插入位点 BamH I 和 Sal I) 并转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞中, 通过细菌体外表达、Glutathione Sepharose 4B 亲和层析和融合蛋白凝血酶在柱切割等操作步骤, 得到 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白;

[0051] 2、将 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白 5ml (浓度 1.1mg/ml) 与弗氏佐剂 5ml 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 $10\mu\text{g}$, 免疫三次。每次免疫两周后经尾动脉取血检测抗体效价。收集抗体效价在 1 : 51200 以上的血清进行后续操作。

[0052] 3、以 $4\mu\text{g/ml}$ 浓度的抗原 (Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白) 包被酶标板, $100\mu\text{l/孔}$, 4°C 过夜;

[0053] 4、洗涤后, 加入待检的血清样品, $100\mu\text{l/孔}$, 37°C 1 小时; 设阴性对照孔;

[0054] 5、洗涤后, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体试剂, $100\mu\text{l/孔}$, 37°C 避光显色 15 分钟; 用 $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ 终止反应后, 阅读各孔的 A490 值。

[0055] 对制备的 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体做 Western Blotting 分析, 结果如图 5 所示。由图 5 可见, Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白抗体检测目标蛋白分子大小正确, 印迹清晰, 对于不同浓度的目标蛋白检测效果良好。经 ELISA 法检测, 抗体能与 Cry1Ab/Cry1Ac 蛋白特异性结合, 其相关系数达到显著水平, 效价 $> 1 : 6000$, 结果如图 6 所示。

[0056] 实施例 3 免疫纳米磁颗粒的制备

[0057] 1、用 30mM 、 $\text{pH} = 5$ 的 MES 缓冲液在外加磁场作用下清洗实施例 1 制备的水溶性羧基纳米磁颗粒, 使水溶性羧基纳米磁颗粒分散于 MES 缓冲液中, 终浓度为 40mg/ml ;

[0058] 2、取水溶性羧基纳米磁颗粒悬浮液 100 μ l, 依次加入 EDC (50mM)、NHS (50mM) 溶液各 50 μ l, 室温震荡 30min;

[0059] 3、在磁场作用下弃上清, 用 MES 溶液清洗 3 次;

[0060] 4、取实施例 2 制备的抗 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的多克隆抗体 (1.09mg/ml) 100 μ l, 加入已活化的水溶性羧基纳米磁颗粒, 室温震荡 30min;

[0061] 5、磁性分离, 收集上清, 用 0.02M 磷酸缓冲液多次洗涤, 得到免疫纳米磁颗粒。

[0062] 实施例 4

[0063] 用本发明所述的制备方法制备完成的用于检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒, 利用化学发光 EIA 进行检测, 具体的操作步骤如下:

[0064] 1、以 5 μ g/ml 的抗原 (Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白) 包被 96 孔酶标板, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜;

[0065] 2、洗涤后, 加入实施例 3 制备的免疫纳米磁颗粒样品, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 1 小时; 设阴性对照孔;

[0066] 3、洗涤后, 加入 ALP (碱性磷酸酶) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (美国 Progteintech 公司), 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 20 分钟;

[0067] 4、加入化学发光底物 AMPPD (3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷) 100 μ l, 放置 30 分钟, 用 0.2M NaOH 终止反应后, 阅读各孔的 A470 值。

[0068] 通过化学发光 EIA 检测, Cry1Ab/Cry1Ac 抗体蛋白包裹的纳米磁颗粒其发光单位为 67.5kcounts/ μ g 磁颗粒; 发光强度和 Cry1Ab/Cry1Ac 蛋白浓度相关性表明, 随着蛋白浓度的不断增加, 发光强度不断下降, 范围在 1-10³ng/ml; 最大检测到的蛋白浓度是 1000ng/ml, 最小检测浓度是 1ng/ml, 结果如图 7 所示。由此可见, 本发明所制备的用于检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒灵敏度较高, 易于磁富集, 操作简单、重复性强, 显示了良好的应用前景。

[0001]

序 列 表

<110> 南京农业大学

<120> 一种检测 Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法

<160> 2

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213>

<220>

<223> Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白氨基酸序列

<400> 1

Met	Asp	Asn	Asn	Pro	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Ile	Pro	Tyr	Asn	Cys
1			5						10					15
Leu	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Glu	Val	Leu	Gly	Gly	Glu	Arg	Ile	Glu
			20						25					30
Thr	Gly	Tyr	Thr	Pro	Ile	Asp	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Gln	Phe
			35						40					45
Leu	Leu	Ser	Glu	Phe	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Leu
			50						55					60
Val	Asp	Ile	Ile	Trp	Gly	Ile	Phe	Gly	Pro	Ser	Gln	Trp	Asp	Ala
			65						70					75
Phe	Leu	Val	Gln	Ile	Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Glu	Glu
			80						85					90
Phe	Ala	Arg	Asn	Gln	Ala	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	Gly	Leu	Ser	Asn
			95						100					105
Leu	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Ala	Glu	Ser	Phe	Arg	Glu	Trp	Glu	Ala	Asp
			110						115					120
Pro	Thr	Asn	Pro	Ala	Leu	Arg	Glu	Glu	Met	Arg	Ile	Gln	Phe	Asn
			125						130					135
Asp	Met	Asn	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Ile	Pro	Leu	Phe	Ala	Val
			140						145					150
Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	Val	Gln	Ala	Ala
			155						160					165
Asn	Leu	His	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	Val	Phe	Gly	Gln
			170						175					180
Arg	Trp	Gly	Phe	Asp	Ala	Ala	Thr	Ile	Asn	Ser	Arg	Tyr	Asn	Asp
			185						190					195
Leu	Thr	Arg	Leu	Ile	Gly	Asn	Tyr	Thr	Asp	His	Ala	Val	Arg	Trp
			200						205					210
Tyr	Asn	Thr	Gly	Leu	Glu	Arg	Val	Trp	Gly					
			215						220					

[0002]

序 列 表

<210> 2

<211> 660

<212> DNA

<213>

<220>

<223> Cry1Ab/Cry1Ac 杀虫蛋白基因序列

<400> 2

```
atggataaca atccgaacat caatgaatgc attccttata attgtttaag taaccctgaa 60
gtagaagtat taggtggaga aagaatagaa actggttaca cccaatcga tatttccttg 120
tcgctaacgc aatttctttt gagtgaattt gttcccgggtg ctggatttgt gttaggacta 180
gttgatataa tatggggaat ttttggtecc tetcaatggg acgcatttct tgtacaaatt 240
gaacagttaa ttaaccaaag aatagaagaa ttcgctagga accaagccat ttctagatta 300
gaaggactaa gcaatcttta tcaaatttac gcagaatctt ttagagagtg ggaagcagat 360
cctactaatc cagcattaag agaagagatg cgtattcaat tcaatgacat gaacagtgcc 420
cttacaaccg ctattcctct ttttgcagtt caaaattatc aagtctctct tttatcagta 480
tatgttcaag ctgcaaattt acatttatca gttttgagag atgtttcagt gtttggacaa 540
aggtggggat ttgatgccgc gactatcaat agtcgttata atgatttaac taggettatt 600
ggcaactata cagatcatgc tgtacgctgg tacaatacgg gattagagcg tgtatgggga 660
```

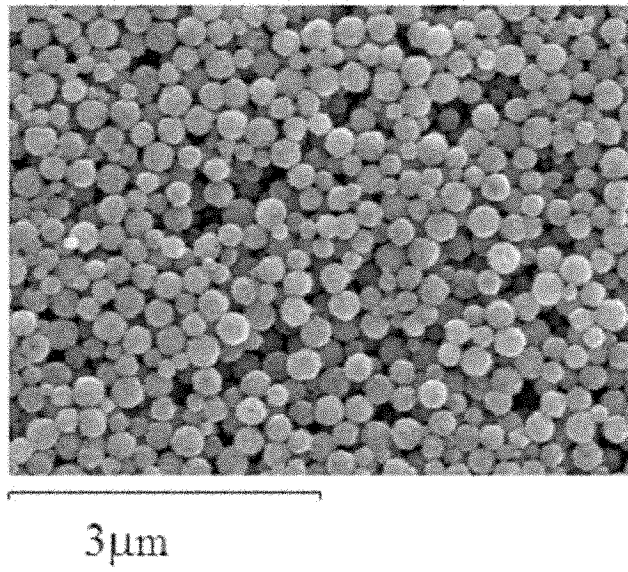


图 1

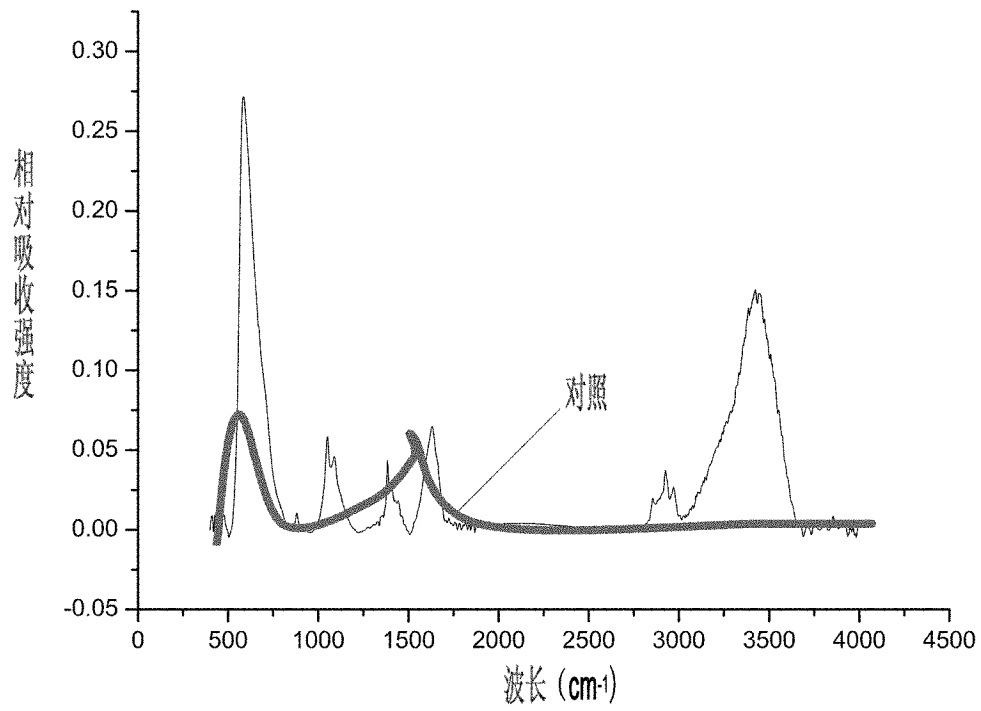


图 2

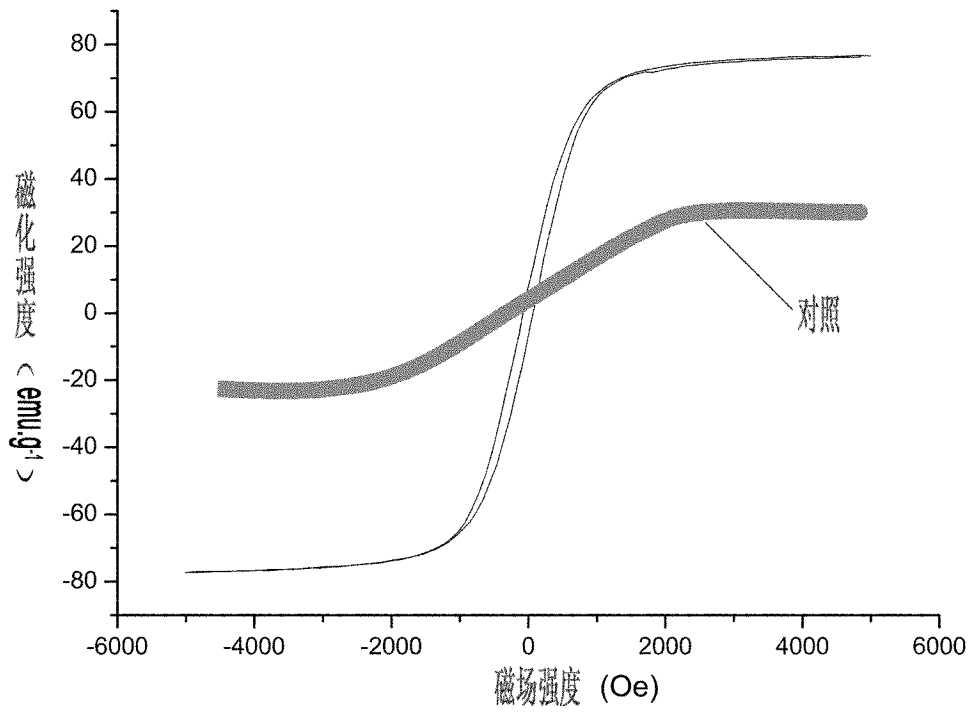


图 3

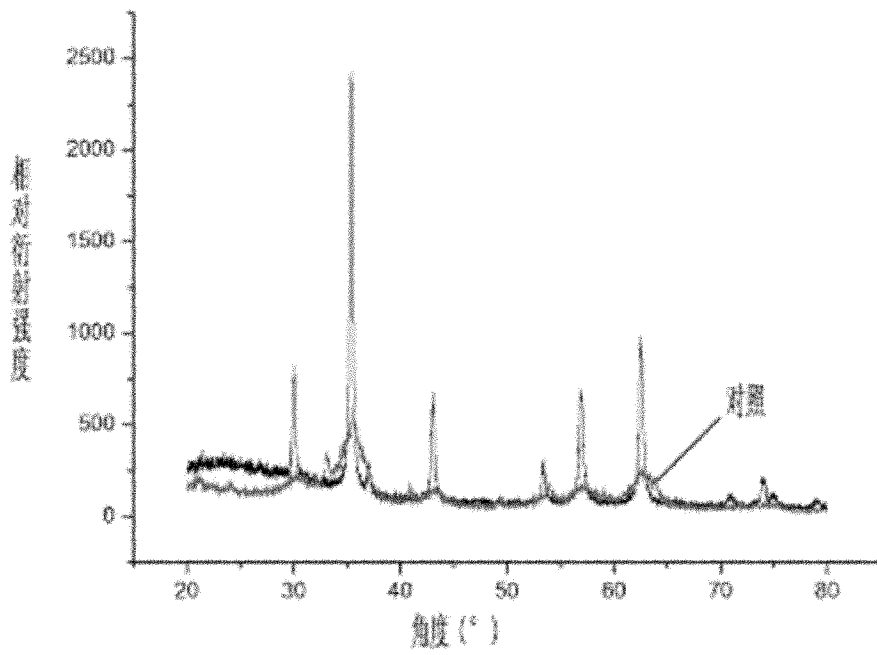


图 4

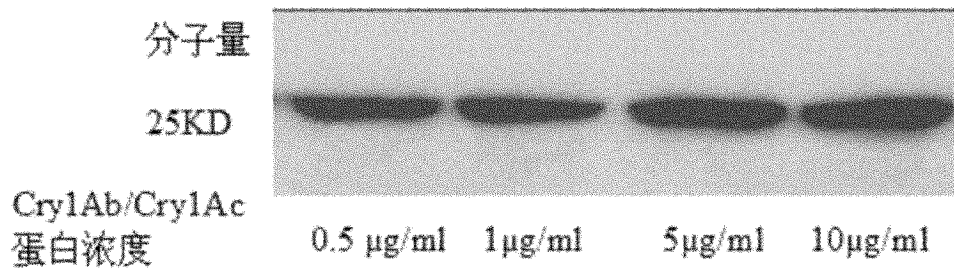


图 5

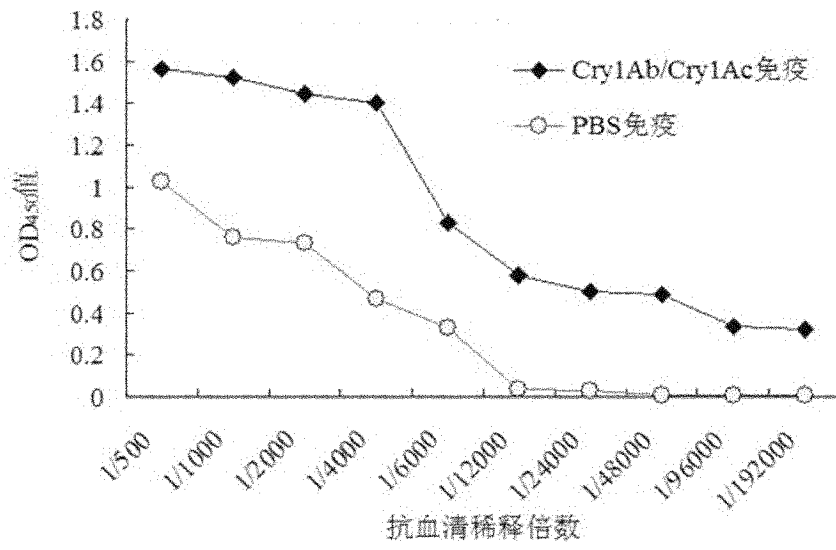


图 6

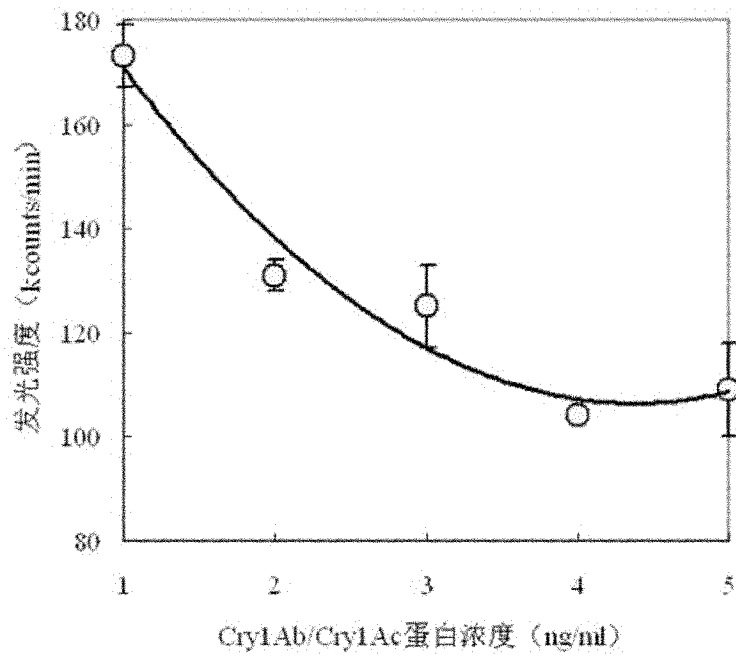


图 7

专利名称(译)	一种检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102175876A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201110036243.7	申请日	2011-02-11
[标]申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京农业大学		
[标]发明人	陈法军 潘卫东		
发明人	陈法军 潘卫东		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒及其制备方法。本发明检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白的免疫纳米磁颗粒，由抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白多克隆抗体包被，磁颗粒大小150~200nm。该免疫纳米磁颗粒是通过改进的化学沉淀法制备具有高度水溶性的羧基纳米磁颗粒，再将抗Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白抗体通过化学偶联法偶联活化后的纳米磁颗粒而得到。使用该免疫纳米磁颗粒通过化学发光EIA法检测Cry1Ab/Cry1Ac杀虫蛋白样品，灵敏度较高，最大检测到的蛋白浓度是1000ng/ml，最小检测浓度是1ng/ml；而且易于磁富集而排除杂质分子干扰。

