

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510011746.3

G01N 33/543

G01N 33/559

G01N 33/535

G01N 21/31

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1696698A

[22] 申请日 2005.5.19

[21] 申请号 200510011746.3

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100083 北京市海淀区圆明园西路 2 号
中国农业大学

[72] 发明人 许文涛 黄昆仑 邓爱科 罗云波

[74] 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司
代理人 司君智

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 PAT 蛋白的亲合层析 - 酶联免疫检测方法及其专用试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种 PAT 蛋白检测方法,更确切地说它是利用免疫亲和层析柱及酶联免疫吸附方法来检测转 bar 和 pat 基因作物及其加工产品中的 PAT 蛋白,属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是:以 PAT 蛋白为抗原进行动物免疫,获得了特异性的多克隆抗体;将此抗体交联到琼脂糖凝胶上,制备免疫亲和层析柱。被检样品经处理后,通过亲和柱以富集其中的 PAT 蛋白;收集亲和柱的洗脱液进行酶联免疫吸附检测,以确定其中的 PAT 蛋白含量。本发明还提供了所述方法的专用试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种利用免疫亲和层析和酶联免疫吸附检测样品中 PAT 蛋白的方法，包括步骤：

(1) 样品前处理；

(2) 制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 PAT 蛋白混合，制备酶标抗原；

(3) 制备 PAT 抗体；

(4) 制备偶联 PAT 抗体的凝胶；

(5) 包被酶标板；

(6) 免疫亲和层析纯化：将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品过柱，洗脱，收集洗脱液；

(7) 酶联免疫吸附检测：将洗脱液加入经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；显色、终止；用酶标仪读取 OD 值；

(8) 绘制标准曲线；

(9) 根据标准曲线对洗脱液中的 PAT 蛋白含量进行定量计算。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其中样品前处理采用称取待测植物组织，经超声波破碎；离心，取上清液过滤；滤过液冻存待测。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备酶标抗原采用将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 PAT 蛋白混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备 PAT 抗体采用将新西兰白兔接种免疫，免疫抗原为 PAT 蛋白，颈动脉放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，之后将过柱获得的液体透析，透析液离心后得含有 PAT 抗体的溶液，冻存备用。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其中制备偶联 PAT 抗体的凝胶

采用先活化凝胶；将活化后的凝胶与 PAT 抗体振荡混匀；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 梯度溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液淋洗，冷藏保存备用。

6、根据权利要求 1 所述的方法，其中包被酶标板采用将 PAT 抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

7、根据权利要求 1 所述的方法，其中免疫亲和层析纯化采用将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品，循环过柱，用甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其中酶联免疫吸附检测采用将样品洗脱液加在经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

9、一种用于权利要求 1-8 所述之任一方法的试剂盒，其特征在于它含有：

A 试剂：标准 PAT 蛋白试剂；

C 试剂：酶标抗原试剂；

K 试剂：偶联 PAT 抗体的凝胶；
包被 PAT 抗体的酶标板。

10、根据权利要求 9 所述的试剂盒，其特征在于它还含有：

B 试剂：稀释液；

D 试剂：酶标抗原稀释液；

E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；

F 试剂：邻苯二胺试剂；

G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；

H 试剂：30% H_2O_2 ；

I 试剂：硫酸溶液；

J 试剂：甘氨酸溶液。

PAT 蛋白的亲合层析-酶联免疫检测方法及其专用试剂盒

技术领域

本发明属免疫学检测领域，涉及一种检测 PAT 蛋白的亲合层析-酶联免疫检测方法及其专用试剂盒。

背景技术

目前，转基因作物涉及的食品原料有大豆、玉米、油菜、棉花、番茄、马铃薯、西葫芦、番木瓜、甜椒等。2000 年转基因大豆、玉米、油菜、棉花占转基因作物种植面积的 99.99%以上，占全球种植面积的 16%。在转基因作物农艺性状上表现出抗除草剂转基因作物所占比例最大，其次是抗虫，再次是双抗（抗除草剂和抗虫）。

Bar 基因和 *pat* 基因均是抗除草剂基因，二者只在核酸序列上稍有差别，它们编码的蛋白是相同的，都是 PAT 蛋白（磷丝菌素乙酰转移酶 phosphintheticin acetyl transferase），且氨基酸序列完全相同。*Bar* 基因和 *pat* 基因作为抗性基因已被广泛应用。此外，在作物中转入其它外源基因时，*bar* 基因和 *pat* 基因还可作为标记基因，目前也已被广泛应用。

目前将 *Bar* 基因和/或 *pat* 基因作为抗性基因和/或标记基因的转基因作物约占总转基因作物的 70%，转入 *bar* 基因和/或 *pat* 基因的作物已经有水稻，小麦，玉米，番茄，棉花，油菜等 20 多种。

随着转基因食品的快速发展，如何正确的评价转基因食品，不仅关系到我国人民的身体健康，而且也关系到我国生物技术在食品工业中的可持续发展。特别在我国加入 WTO 以后，国外转 *bar* 和/或 *pat* 基因的作物和食品大量进入我国，转 *bar* 基因和/或 *pat* 基因的食品检测技术是转基因食品安全性评价的重要技术平台，其研究具有重要的意义。

目前在我国还没有见到有关转 *bar* 基因和/或 *pat* 基因食品检测技术的研究报道。在国际上转 *bar* 基因和/或 *pat* 基因食品检测最常用的技术是 PCR 技术,但在 PCR 反应中,许多因素会影响反应的进行,导致反应效率下降、非特异性片段的扩增、假阳性和阴性的出现等。

发明内容

本发明目的在于提供一种样品前处理简单,灵敏度高,特异性强,快速高效,适于大批量样品筛选的 PAT 蛋白检测方法;并开发出结构简单,使用方便,价格便宜,便于携带的 PAT 蛋白检测试剂盒;从而解决了对转 *bar* 基因和/或 *pat* 基因作物及其加工产品从蛋白水平上进行定量检测的需求。

本研究将免疫亲和层析(IAC)技术与酶联免疫吸附(ELISA)技术结合起来实现了对转基因农作物中 PAT 蛋白的特异性检测,完成了本发明。

本发明提供了一种检测 PAT 蛋白的方法,其特征在于,先用免疫亲和层析方法将待测样品中的 PAT 蛋白富集纯化,再通过酶联免疫吸附方法来定量检测 PAT 蛋白。

所述方法包括如下步骤:

- (1) 样品前处理;
- (2) 制备酶标抗原:将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 PAT 蛋白混合,制备酶标抗原;
- (3) 制备 PAT 抗体;
- (4) 制备偶联 PAT 抗体的凝胶;
- (5) 包被酶标板;
- (6) 免疫亲和层析纯化:将偶联抗体的凝胶装柱,加入样品过柱,洗脱,收集洗脱液;
- (7) 酶联免疫吸附检测:将洗脱液加入经抗体包被的酶标板上,温育后洗涤拍干;加入酶标抗原,温育后洗涤拍干;显色、终止;用

酶标仪读取 OD 值；

(8) 绘制标准曲线；

(9) 根据标准曲线对洗脱液中的 PAT 蛋白含量进行定量计算。

优选地，样品前处理采用称取待测植物组织，经超声波破碎；离心，取上清液过滤；滤过液冻存待测。

优选地，制备酶标抗原采用将活化的辣根过氧化物酶与纯化的 PAT 蛋白混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点。

优选地，制备 PAT 抗体采用将新西兰白兔接种免疫，免疫抗原为 PAT 蛋白，颈动脉放血；分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，之后将过柱获得的液体透析，透析液离心后得含有 PAT 抗体的溶液，冻存储备用。

优选地，制备偶联 PAT 抗体的凝胶采用先活化凝胶；将活化后的凝胶与 PAT 抗体振荡混匀；离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体；依次用不同 pH 梯度溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液淋洗，冷藏保存备用。

优选地，包被酶标板采用将 PAT 抗体包被在酶标板上，冷藏过夜；洗涤拍干。

优选地，免疫亲和层析纯化采用将偶联抗体的凝胶装柱，加入样品，循环过柱，用甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

优选地，酶联免疫吸附检测采用将样品洗脱液加在经抗体包被的酶标板上，温育后洗涤拍干；加入酶标抗原，温育后洗涤拍干；继而加入底物混合液显色；终止反应；用酶标仪读取 OD 值。

本发明还提供了一种用于所述方法的试剂盒，其特征在于它含有：

A 试剂：标准 PAT 蛋白试剂；

C 试剂：酶标抗原试剂；

K 试剂：偶联 PAT 抗体的凝胶；
包被 PAT 抗体的酶标板。

优选地，所述的试剂盒还含有：

B 试剂：稀释液；
D 试剂：酶标抗原稀释液；
E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；
F 试剂：邻苯二胺试剂；
G 试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；
H 试剂：30% H_2O_2 ；
I 试剂：硫酸溶液；
J 试剂：甘氨酸溶液。

本发明技术方案详述如下：

(1) 称取 2g 植物组织，加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5)，经超声波破碎；然后 12000rpm/min 离心 30 min，重复两次以去除不溶性的组织碎片，抽取上清液经滤膜过滤。滤过液-20℃冻存待测；整个操作过程要避免过热导致蛋白变性。

(2) 制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的 PAT 混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点。

(3) 制备多克隆 PAT 抗体

a. 免疫用抗原：免疫剂量每次 1mg/ml PAT 蛋白，首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化。

b. 动物免疫：将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔两周，一共免疫 5 次；在最后一次直接肌肉注射，一周后从兔耳静脉采血以检测抗血清效价；之后颈动脉放血。

c. 分离血清：以 30%-60%的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗体免疫球蛋白，之后将过柱获得的液体用 Ph 7.4 含 0.15 mol/L NaCl

的 PBS（磷酸盐缓冲液）连续透析 3 d，每天换液 2 次，取出透析液进行离心后得含有多克隆 PAT 抗体的溶液；-70℃ 保存备用。

（4）制备偶联抗体的 sepharose-4B 凝胶

a. 活化凝胶：用溴化氰 CNBr 活化 sepharose-4B 凝胶。并用低浓度 HCl 溶液反复洗涤凝胶；在偶联抗体前先用磷酸缓冲液平衡 sepharose-4B 凝胶。

b. 交联抗体：将凝胶与适当稀释的 PAT 抗体振荡混匀，使抗体吸附到活化的 sepharose-4B 凝胶颗粒上。

c. 洗脱杂蛋白：离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体。

d. 封闭：依次用不同 pH 溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液（加入 NaN_3 至终浓度 0.02%）淋洗，4℃ 保存备用。

（5）包被酶标板：将抗体包被在酶标板上，100ul/孔，放入 4℃ 冰箱过夜；再加入 E 洗涤液，250ul/孔，洗涤 3 次，每次 3 min；放在吸水纸上拍干。

（6）取 5 ml 偶联抗体 sepharose-4B 凝胶，装柱，先加入含吐温-20 的磷酸盐 PBS 洗涤液平衡，直至流出液的 OD 280 值小于 0.5；再加入等体积待测样品溶液，4℃ 循环过柱。之后用 0.1 mol/L、pH 2.5 甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱液。

（7）在酶标板中加入待测样品洗脱液，37℃ 温育 0.5h，之后洗涤拍干；加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃ 温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul 终止液；测定：目测后，酶标仪读取各孔 OD 值。

（8）绘制标准曲线：用 PAT 蛋白标准品配制 PAT 蛋白浓度梯度溶液，经步骤（7），获取各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；

（9）根据标准曲线对样品洗脱液中的 PAT 蛋白含量进行定量计算。

PAT 蛋白检测试剂盒的组建：

A 试剂：标准 PAT 试剂；B 试剂：稀释液；C 试剂：酶标抗原试剂；D 试剂：酶标抗原稀释液；E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；F 试剂：邻苯二胺试剂；试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；H 试剂：30% H_2O_2 ；I 试剂：硫酸溶液；J 试剂：甘氨酸溶液；K 试剂：偶联抗体 sepharose-4B 凝胶；包被 PAT 抗体的酶标板（真空包装，于 4 °C 保存）。

本试剂盒是以多克隆抗体免疫亲和柱为富集纯化装置，再通过酶联免疫吸附方法来检测 PAT 蛋白。

本发明将免疫亲和层析技术（IAC）与酶联免疫技术（ELISA）结合起来实现了 PAT 蛋白的特异性检测，从而解决了对转 bar 和 pat 基因作物及其加工产品从蛋白水平上进行定量检测的需求。本发明是目前国内外首次实现对 PAT 蛋白的定量检测技术，该项研究填补了国内外该领域的研究空白。IAC-ELISA 试剂盒比普通 ELISA 试剂盒的检测限要低一个数量级，且灵敏快速，前处理简单，回收率高，结果重复性好，适于大批量样品的筛选。

使用 IAC-ELISA 检测技术对转基因作物 PAT 蛋白可以达到 0.3% 的检测限。对转基因油菜 MS1/RF1 可以达到 0.5% 的检测限；对转基因油菜 MS3/RF8 同样可以达到 0.5% 的检测限。

本发明检测方法有如下优点：

1. 灵敏度高，检测限低，回收率高，结果重复性好；
2. 特异性强：IAC 和 ELISA 方法均建立在抗体和抗原的特异性结合，且所得抗体交叉反应率极低；
3. 检测成本低廉，无需大型仪器设备，适于推广；
4. 样品预处理简单，无需无菌化处理，样品提取方便快捷；
5. 通过酶标仪判读，结果具有客观性和不可更改性；
6. 简单易行，操作人员只需最基本的实验知识，可标准化为产品；

7. 检测时间短，整个操作过程不到 2.5 个小时；
8. 可以进行大批量检测。

附图说明

图 1: PAT 蛋白的检测标准曲线图。

图 2: 转基因玉米 Bt11、Bt176 和基因油菜 MS1/RF1、MS8/RF3 的 IAC-ELISA 检测结果图。

具体实施方式

下面结合具体实例，进一步阐述本发明。应理解，这些实例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。

实施例 1:

1、样品前处理:

分别称取转基因玉米 Bt11、Bt176 和基因油菜 MS1/RF1、MS8/RF3 的叶片组织 2g，加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5)，经超声波破碎。然后 12000rpm/min 离心 30 min，重复两次以去除不溶性的组织碎片，抽取上清液经孔径为 3 MM 的 whatman 滤膜过滤。滤过液 -20℃ 冻存待测；整个操作过程要避免过热导致蛋白变性。

2、制备酶标抗原：将活化的辣根过氧化物酶（HRP）与纯化的 PAT 蛋白混合，在碳酸缓冲体系中进行标记反应，之后加入硼氢化钠还原未结合位点。

3、制备多克隆 PAT 抗体

a. 免疫用抗原：免疫剂量每次 1mg/ml PAT 蛋白，首次免疫用 1ml 完全福氏佐剂乳化，加强免疫时用 1ml 不完全福氏佐剂乳化。

b. 动物免疫：将新西兰白兔饲养数周后接种免疫，每次免疫间隔两周，一共免疫 5 次；在最后一次直接肌肉注射，一周后从兔耳静脉采血以检测抗血清效价；之后颈动脉放血。

c. 分离血清：以 30%-60% 的硫酸铵分级沉淀血清中杂蛋白和抗

体免疫球蛋白，之后将过柱获得的液体用 pH 7.4 含 0.15 mol/L NaCl 的 PBS（磷酸盐缓冲液）连续透析 3 d，每天换液 2 次，取出透析液进行离心后得含有多克隆 PAT 抗体的溶液；-70℃保存备用。

4、制备偶联抗体的 sepharose-4B 琼脂糖凝胶

a. 活化凝胶：用 CNBr 活化 sepharose-4B 凝胶。并用低浓度 HCl 溶液反复洗涤凝胶；在偶联抗体前先用磷酸缓冲液平衡 sepharose-4B 凝胶。

b. 交联抗体：将凝胶与适当稀释的 PAT 抗体振荡混匀，使抗体吸附到活化的 sepharose-4B 凝胶颗粒上。

c. 洗脱杂蛋白：离心洗涤以洗脱杂蛋白和未结合的抗体。

d. 封闭：依次用不同 pH 溶液轮流洗涤封闭未结合的活性基团，再用磷酸缓冲液（加入 NaN_3 至终浓度 0.02%）淋洗，4℃保存备用。

5、配制试剂

标准 PAT 试剂：PAT 标准品加稀释液（PBS 磷酸缓冲液, pH 7.4）混匀，配成梯度溶液。

酶标抗原试剂：酶标抗原加 10ml 酶标抗原稀释液（PBS 磷酸缓冲液含 0.1% 明胶, pH 7.4）溶解，混匀。

洗涤液配制：在含有 0.1% 吐温-20 的磷酸盐（PBS）固体中加入 200 ml 蒸馏水配制洗涤液，用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制：用 20 ml 醋酸钠-柠檬酸缓冲液稀释 40mg 邻苯二胺，再加入 6ul 30% H_2O_2 ，配制成底物混合液，现用现配。

6、包被酶标板：将抗体包被在酶标板上，100ul/孔，放入 4℃冰箱过夜；再加入洗涤液，250ul/孔，洗涤 3 次，每次 3 min；放在吸水纸上拍干。

7、取 5 ml 偶联抗体 sepharose-4B 凝胶，装柱，先加入洗涤液平衡，直至流出液的 OD 280 值小于 0.5；再加入等体积待测样品溶液，4℃循环过柱。之后用 0.1 mol/L、pH 2.5 甘氨酸溶液洗脱，收集洗脱

液。

8、在酶标板中加入待测样品洗脱液及标准 PAT 试剂，37℃温育 0.5h，之后洗涤拍干；加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃温育 0.5h；洗涤拍干；每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；每孔加入 50ul 终止液（硫酸溶液）；酶标仪读取各孔 OD 值。

9、绘制标准曲线：用 PAT 蛋白标准品所获各梯度溶液 OD 值，绘制标准曲线；结果见图 1。

10、根据标准曲线对样品洗脱液中的 PAT 蛋白含量进行定量计算。

结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 PAT 浓度的下降而升高，将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，为了减少结果判断的误差，若检测样品的 OD 值比非转基因食品的检测值高出 0.3 则被判断为阳性，结果见图 2。

检测结果：转基因玉米 Bt11, Bt176 的检测限达到 10%，而转基因油菜 MS1/RF1，MS8/RF3 的检测限达到 0.5%。

实施例 2:

PAT 蛋白检测试剂盒的组建:

A 试剂：标准 PAT 试剂；B 试剂：稀释液；C 试剂：酶标抗原试剂；D 试剂：酶标抗原稀释液；E 试剂：含吐温-20 的磷酸盐 PBS 固体；F 试剂：邻苯二胺试剂；试剂：醋酸钠-柠檬酸缓冲液；H 试剂：30% H_2O_2 ；I 试剂：1M 硫酸溶液；J 试剂：甘氨酸溶液；K 试剂：偶联抗体 sepharose-4B 凝胶；包被 PAT 抗体的酶标板。

实施例 3

1、样品前处理:

分别称取转基因玉米 Bt11, Bt176, 转基因油菜 MS1/RF1，MS8/RF3 叶片组织 2g, 加入 5ml PBS/0.01 M EDTA (pH 7.5), 经超声

波破碎。然后 12000rpm/min 离心 30 min，重复两次以去除不溶性的组织碎片，抽取上清液经孔径为 3 MM 的 whatman 滤膜过滤。滤过液-20℃冻存待测；整个操作过程要避免过热导致蛋白变性。

2、试剂的配制

标准 PAT 试剂：PAT 标准品加 B 试剂混匀，配成梯度溶液。

酶标抗原试剂：C 试剂加 10ml D 试剂溶解，混匀。

E 洗涤液配制：在 E 试剂中加入 200 ml 蒸馏水配制 E 洗涤液，用于酶标板的洗涤。

底物混合液的配制：用 20 ml G 试剂稀释 40mg F 试剂，再加入 6ul H 试剂，配制成底物混合液，现用现配。

3、IAC 富集：取 5 ml K 试剂装柱，先加入 E 洗涤液平衡，直至流出液的 OD 280 值小于 0.5。再加入等体积待测样品溶液，4℃循环过柱。之后用 J 试剂洗脱，收集洗脱液。

4、加样：包被 PAT 抗体的酶标板中加入待测样品洗脱液和 PAT 标准溶液。37℃温育 0.5h。之后洗涤拍干。

酶标板上，第 1 排标准对照，在前 11 孔加入 PAT 梯度溶液，第 12 孔加入空白对照，加入量为 100ul。其余各孔则加入待测的样品洗脱液，加入量 100ul。

5、加酶：加入 100ul 酶标抗原溶液，37℃温育 0.5h；洗涤拍干；显色：每孔加入 150ul 底物混合液，室温显色 15min；终止：每孔加入 50ul I 试剂；测定：目测后，酶标仪读取各孔 OD 值。

6、结果判定：标准对照孔的 OD 值随着 PAT 浓度的下降而升高，第 12 孔 OD 值应最高；将样品检测孔 OD 值与标准对照孔的 OD 值比较，为了减少结果判断的误差，若检测样品的 OD 值比非转基因食品的检测值高出 0.3 则被判断为阳性。见图 2。

7、检测结果：转基因玉米 Bt11, Bt176 的检测限达到 10%，而转基因油菜 MS1/RF1，MS8/RF3 的检测限达到 0.5%。

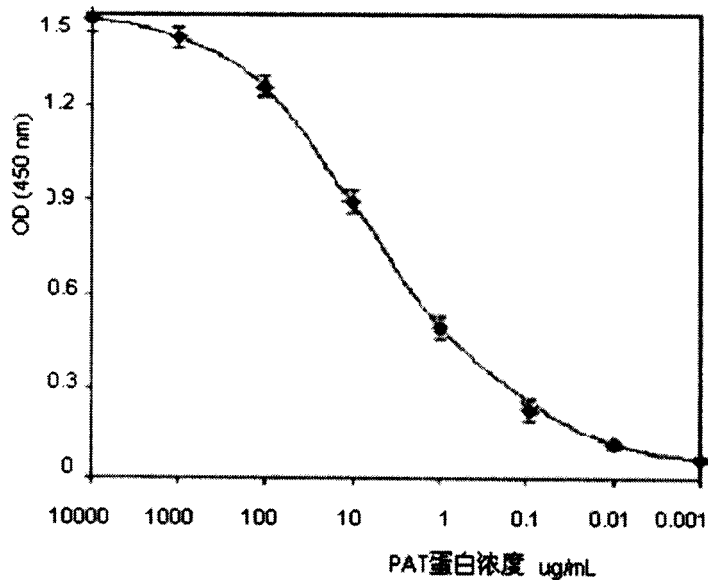


图 1

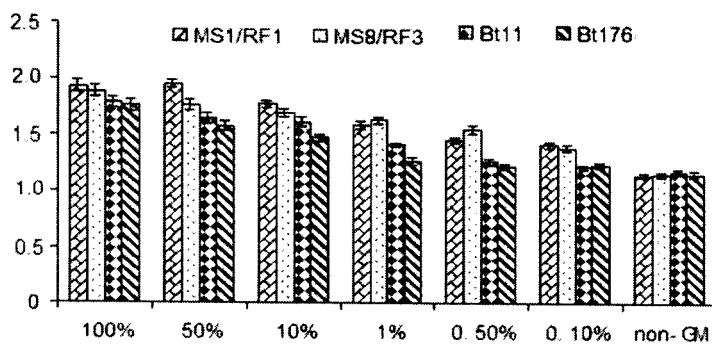


图 2

专利名称(译)	PAT蛋白的亲和层析 - 酶联免疫检测方法及其专用试剂盒		
公开(公告)号	CN1696698A	公开(公告)日	2005-11-16
申请号	CN200510011746.3	申请日	2005-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	许文涛 黄昆仑 邓爱科 罗云波		
发明人	许文涛 黄昆仑 邓爱科 罗云波		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/559 G01N33/535 G01N21/31		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种PAT蛋白检测方法，更确切地说它是利用免疫亲和层析柱及酶联免疫吸附方法来检测转bar和pat基因作物及其加工产品中的PAT蛋白，属于免疫学和食品安全检测技术领域。本发明的方法是：以PAT蛋白为抗原进行动物免疫，获得了特异性的多克隆抗体；将此抗体交联到琼脂糖凝胶上，制备免疫亲和层析柱。被检样品经处理后，通过亲和柱以富集其中的PAT蛋白；收集亲和柱的洗脱液进行酶联免疫吸附检测，以确定其中的PAT蛋白含量。本发明还提供了所述方法的专用试剂盒。

