

1. 一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)的免疫金颗粒试剂条的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

- 1) 重新优化 CpTI 基因密码子,构建 CpTI 基因表达序列;
- 2) 构建 CpTI 基因和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体;
- 3) 在细菌表达 GST-CpTI 融合蛋白后,通过亲和层析柱谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 纯化融合蛋白,切除 GST, 纯化 CpTI 蛋白;
- 4) 将 GST-CpTI 融合蛋白免疫兔,分离纯化得到兔抗 CpTI 多克隆抗体;
- 5) 将 CpTI 蛋白免疫雌性 Balb/C 小鼠,得到稳定分泌单克隆抗体细胞株并进行细胞培养,注射小鼠,获得单克隆抗体;
- 6) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;
- 7) 通过夹心法获得检测 CpTI 蛋白的免疫金颗粒试剂条。

2. 根据权利要求 1 所述的检测豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)的免疫金颗粒试剂条的制备方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的原核表达载体是 pGEX-6P-1,构建完成后的融合表达载体是 pGEX-6P-1-CpTI。

检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫金颗粒试剂条的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制剂技术领域,尤其涉及一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫金颗粒试剂条的制备方法。

背景技术

[0002] 豇豆胰蛋白酶抑制剂 (Cowpea Trypsin Inhibitor, CpTI) 属丝氨酸蛋白酶抑制剂,是一种植源性的杀虫蛋白,能杀死大多数农业害虫(如大多数的鳞翅目、直翅目、双翅目、膜翅目及某些鞘翅目昆虫)。其杀虫机理在于它能与昆虫消化道内的蛋白消化酶相互作用,形成酶抑制剂复合物(EI),阻断或削弱消化酶的蛋白水解作用。进一步通过神经系统的反馈,使昆虫产生厌食反应,最终造成昆虫的非正常发育而死亡。杀虫谱检测表明,CpTI 几乎对所有测试的主要农业害虫都有抑制作用,包括大部分的鳞翅目害虫和部分鞘翅目害虫,杀虫谱极广。由于它直接作用于昆虫的消化酶,还具有不易产生抗药性的特点。因此它已成为目前除 Bt 毒蛋白外使用得最为广泛的杀虫蛋白。

[0003] 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。目前,对于转基因植物中 CpTI 的检测有 3 种方法,一是生物测定,二是酶抑制法,三是免疫测定法。生物测定时间长,易受环境条件的干扰,对于不同时期的样品很难比较。酶抑制法测定时经常会受到植物色素及酚类等次生物质的干扰。免疫测定法虽然测定简单和准确,但在实际操作过程中仍然难以达到高效、快速完成测定之目的。有鉴于国内外对于 CpTI 抑制剂免疫检测技术的研究报告和相关专利技术较少涉猎,开发高效、准确、快速的新型 CpTI 蛋白免疫检测技术和产品尤为迫切。

发明内容

[0004] 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金颗粒试剂条的制备方法,通过本方法获得的免疫金颗粒试剂条,能定性检测植株中是否含有 CpTI 蛋白,并且试剂条操作简单,不污染环境。

[0005] 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(CpTI)的免疫金颗粒试剂条的制备方法,包括以下步骤:

- 1) 重新优化 CpTI 基因密码子,构建 CpTI 基因表达序列;
- 2) 构建 CpTI 基因和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体;
- 3) 在细菌表达 GST-CpTI 融合蛋白后,通过亲和层析柱谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathione Sepharose) 4B 纯化融合蛋白,切除 GST,纯化 CpTI 蛋白;
- 4) 将佐剂溶合抗原(GST-CpTI 融合蛋白)免疫兔,分离纯化得到兔抗 CpTI 多克隆抗体;
- 5) 将 CpTI 蛋白免疫雌性 Ba1b/C 小鼠,得到稳定分泌单克隆抗体细胞株并进行细胞培养,注射小鼠,获得单克隆抗体;
- 6) 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金;

7) 通过夹心法获得检测 CpTI 蛋白的免疫金颗粒试剂条。

[0006] 所述步骤 2) 中的原核表达载体是 pGEX-6P-1, 构建完成后的融合表达载体是 pGEX-6P-1-CpTI。

[0007] 本发明的有益效果为:首次采用胶体金标记技术检测转基因植物,建立了 CpTI 胶体金标检测试剂条,这对转基因植物的快速检测、安全性研究及其产业化进程都具有不可估量的重要意义;将胶体金标记法与免疫层析检测技术结合,使所有样品都通过较窄的硝酸纤维素膜的持续性反应,实际上对被检样品起到了浓缩作用,从而使免疫层析法比免疫渗滤法更为敏感,此法无需洗涤,大大减少了污染机会,操作简单,整个过程只需 5-30 分钟即可看到结果;在试剂条的选材上采用硝酸纤维素膜,生产中采用机械喷膜,提高检测的可观性;通过夹心法制备胶体金试剂条,使得检测的特异性大大增加,能定性检测植株中是否含有 CpTI 蛋白,检测 CpTI 融合蛋白最低限为 10 ng/ml;本试剂条操作简单,不污染环境,无需专业实验设备和专门培训的人员,试剂条的运输和保存较方便,适合应用于现场对转 CpTI 基因的植物进行快速检测;可以用于定量或半定量检测试剂条的进一步研制。

附图说明

[0008] 图 1 为本发明实施例所述的一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫金颗粒试剂条的制备方法中优化后的 CpTI 基因序列图谱。

具体实施方式

[0009] 一种检测豇豆胰蛋白酶抑制剂(CpTI)的免疫金颗粒试剂条的制备方法,包括以下步骤:

1、重新优化 CpTI 基因密码子,构建 CpTI 基因表达序列,具体包括:

如图 1 所示,为优化后的 CpTI 基因序列图谱,构建 CpTI 基因表达序列:根据已发表 CpTI 基因序列设计点突变引物,分别进行三组 PCR 反应,引物序列如下:

CPTI 基因的 PCR 引物:

Primer1(上链):5' - ATGGATTTGAACCACCTCGGAAGT -3'

Primer2(上链):5' -TTACTCATCATCTTCATCCCTGGACT -3'

CPTI 突变 EcoRI 引物:

Primer3(上链):5' -CAGGTGGAACCTCGTGTCAC -3'

Primer4(上链):5' -GTGACACGAGTTCCACCTG -3'

分别利用 Primer1 和 Primer4, Primer3 和 Primer2 进行 PCR 反应,以上述 PCR 产物为模板,Primer1 和 Primer2 为引物进行 PCR 反应,程序如下:94℃,3min 预变性;94℃,30s,53℃,30 s,72℃,30 s,35 个循环,72℃延伸 7min,获得 EcoRI 位点被修饰的 CPTI 基因。

[0010] 2、构建 CpTI 基因和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)基因融合表达载体,具体包括:

1) 将 CpTI 基因片段通过限制酶切割插入 pGEX-6P-1 载体中,构建细菌融合表达载体 pGEX-6P-1-CpTI;

2) 将融合表达载体 pGEX-6P-1-CpTI 转化大肠杆菌 BL21;

3) 对融合蛋白进行最佳诱导条件确定并且做 SDS-PAGE 检测。

[0011] 3、在细菌表达 GST-CpTI 融合蛋白后,通过亲和层析柱谷胱甘肽琼脂糖凝胶

(Glutathione Sepharose) 4B 纯化融合蛋白, 切除 GST, 纯化 CpTI 蛋白, 具体包括:

1) 将工程菌在含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 液体培养基中 37°C , 200 rpm 振荡培养过夜, 按 1:100 的比例接种到含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 的新鲜 LB 液体培养基中, 在摇床中振荡培养 (37°C , 200 rpm) 至 OD_{600} 达到 0.4-0.6 后, 加入 IPTG 至终浓度 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 23°C 振荡培养, 诱导表达 8 小时, 收集菌体重悬于 PBS (pH7.3) 缓冲液, 冰浴下超声波 (功率 400W、5 s 间隔、3s 超声) 处理至菌液粘稠透亮, 4°C 用 Glutathione Sepharose 4B 柱过柱纯化;

2) 将纯化后的 GST-CpTI 融合蛋白过柱 (Glutathione Sepharose 4B), 柱上加入 PreScission Protease ($100 \mu\text{g}$ 蛋白加入 2 Units PreScission Protease) 切去除氨基端的 GST 片段, 酶切的条件为 4°C , 14 小时, 酶切后收集流出的 CpTI 蛋白。

[0012] 4、将佐剂溶合抗原 (GST-CpTI 融合蛋白) 免疫兔, 分离纯化得到兔抗 CpTI 多克隆抗体, 具体包括:

1) 收集正常血清: 抗原注射以前收集一些正常血清, 以备检测抗体时作为阴性对照;

2) 动物免疫: 将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, 每次免疫的抗原量约 $100 \mu\text{g}$, 免疫三次, 每次免疫两周后经耳动脉取血检测抗体效价, 两只免疫的兔子分别编号为 H-3 和 H-4;

3) 取血: 最后一次取血采用颈动脉放血, 收集血清;

4) 血清的分离: 将盛血的器皿倾斜放置于 37°C 烘箱 2hr, 转移到 4°C 沉淀过夜, 第二天早上用吸管吸取血清, 分装后 -20°C 保存;

5) 效价测定:

5.1 以适宜浓度的抗原包被酶标板, $100 \mu\text{l}$ /孔, 4°C 过夜;

5.2 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;

5.3 洗涤后, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 的抗体试剂, $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 避光显色 15 分钟, 用 2 mol/L H_2SO_4 终止反应后, 阅读各孔的 A490 值。

[0013] 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 $>1:8000$ 。

[0014] 5、将 CpTI 蛋白免疫雌性 Balb/C 小鼠, 得到稳定分泌单克隆抗体细胞株并进行细胞培养, 注射小鼠, 获得单克隆抗体, 具体包括:

1) 免疫 (分为 3 组): 选择 8 周龄 BALB/c 健康雌性小鼠 6 只, 分为 3 组, 每组 2 只;

2) 杂交瘤融合: 将 CpTI 蛋白与等量的弗氏完全佐剂混匀成膏状, 对雌性 Balb/C 小鼠进行腹股沟皮下注射, 每只小鼠注射 0.2 mL , 免疫浓度为 $75 \mu\text{g/mL}$, 共注射 6 只小鼠, 间隔 3 周后加强免疫, 将 CpTI 蛋白与等量的弗氏完全佐剂混匀成膏状, 每只 Balb/c 小鼠注射 0.2 mL , 免疫浓度为 $37.5 \mu\text{g/mL}$, 两周后, 取尾血 $10 \mu\text{l}$, 按 1:5000 的比例稀释后进行抗体效价检测, 取效价最高的 1 只小鼠做冲击免疫, 用量同于加强免疫, 给小鼠做腹腔注射, 三天后用于制备脾细胞, ELISA 法检测抗体;

3) 单克隆抗体亚类鉴定: 用 Roche 公司的“一步法”小鼠单克隆抗体分型试剂盒检测阳性单克隆的亚型, 最后得到 3 株稳定分泌单克隆抗体细胞株。

[0015] 4) 单抗纯化: 采用 GE 生产的 HiTrap Protein A 纯化腹水中的单克隆抗体, 取少量纯化出的样品进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 扫描分析纯化结果。

[0016] 得到 2 株稳定分泌单克隆抗体细胞株, 平均每只 Balb/c 小鼠注射细胞后产生 3~

5 ml 腹水,经过 HiTrap Protein A 纯化后,得到两种纯度大于 90% 的单抗,SDS-PAGE 跑胶结果显示轻链分子量大小为 20 KDa-30 KDa,重链分子量大小为 50 KDa-60 KDa。

[0017] 6、采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金,具体包括:

用 0.2M 的碳酸钾调节胶体金溶液(10 ml)的 pH 值至 7.8,加入 1 ml 多抗于胶体金溶液中,缓慢均匀搅拌 20 分钟,加入 0.1 g BSA 封闭;静置 5 分钟后,加入 1 ml 10% 的 NaCl 溶液,搅拌均匀后分装成 3 管,16,000 rpm,4°C 离心 30 min,小心吸去上清,最后每管沉淀物用 100 μ l PBS 重悬,所得溶液即为免疫金,制得的免疫金保存于 4°C 冰箱。

[0018] 7、通过夹心法获得检测 CpTI 蛋白的免疫金颗粒试剂条,具体包括:

将胶体金结合垫(玻璃纤维)浸入上述制备好的免疫金溶液中 30min,室温过夜干燥,在 NC 膜(硝酸纤维素膜)上用浓度为 345 μ g/ml 的 CpTI 蛋白 1 μ l 包被,加入 1000 倍稀释后的羊抗兔 IgG (质控线)1 μ l,室温干燥后再加入 10%BSA 10 μ l 封闭,在塑料底板上分别固定 NC 膜、吸收垫、金标垫及样品垫依次组装,用切割机切条,即为 CpTI 胶体金免疫层析试剂条,将组装好的试剂条置于 37°C 温箱温育 2 小时后取出。

[0019] 用本免疫金颗粒试剂条检测时,在样品垫加入一定量的液体样本,借助毛细管作用,样本沿样品垫到吸水垫的方向移动,首先经过干燥金标垫,使金标结合物复溶,如果标本中有待测抗原,则发生抗原抗体反应,形成复合物 A (金颗粒-抗体-抗原),样本继续移动到达检测带位置,则不会与包被抗原发生抗原抗体反应,则不能形成肉眼可见的红色条带,为阳性结果;如果标本中无待检抗原,则金标抗体与检测带的抗原结合,形成红色条带,为阴性结果。

[0020] 用本发明制备的免疫金颗粒试剂条检测转 CpTI 基因棉叶结果如下:

用非转基因棉花汁液作为阴性对照,阴性植株试纸条上呈现两条红色的胶体金聚集条带,而 CpTI 蛋白浓度在 10 μ g/ml 以上时,检测条上只呈现一条带,转基因棉花液汁检测呈阳性。

序列表

[0001]	<110> 中国环境科学研究院	
[0002]	<120> 检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫金颗粒试剂条的制备方法	
[0003]	<140>201110189154.6	
[0004]	<141>2011-07-06	
[0005]	<160>1	
[0006]	<210>1	
[0007]	<211>324	
[0008]	<212>DNA	
[0009]	<213> 人工序列	
[0010]	<400>1	
[0011]	atgatggtgc taaaggtgtg tgtgctggta cttttccttg taggggttac tactgcagec	60
[0012]	atggatctga accacctcgg aagtaatcat catgatgact caagcgatga accttctgag	120
[0013]	tcttcagaac catgctgcga ttcatgcatc tgcactaaat caatacctcc tcaatgceat	180
[0014]	tgtacagata tcaggttgaa gtcgtgtcac tcggcttgca aatcctgcat gtgtacacga	240
[0015]	tcaatgccag gcaagtgctg ttgccttgac attgctgatt tctgttacia accttgcaag	300
[0016]	tccagggatg aagatgatga gtaa	324

```
atgatggtgc taaaggtggtg tggctggta ctttccttg tagggttac tactgcagcc*  
*  
atgatctga accacctgg aagtaatcat catgatgact caagcgatga accttctgag*  
*  
tcttcagaac catgctgga ttcattgcat tgcactaat caatacctcc tcaatgccat*  
*  
tgtacagata tcaggttga gtcgtgac tcgcttgca aatcctgcat gtgtacaga*  
gaa ttc*  
tcaatgccag gcaagtgtg ttgccttgac attgctgatt tctgttaca accttgcaag*  
*  
tccagggatg aagatgatga gtaa*
```

图 1

专利名称(译)	检测豇豆胰蛋白酶抑制剂的免疫金颗粒试剂条的制备方法		
公开(公告)号	CN102279272A	公开(公告)日	2011-12-14
申请号	CN201110189154.6	申请日	2011-07-06
[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 孔瑾 高轶楠 李俊生		
发明人	肖能文 孔瑾 高轶楠 李俊生		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
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 (CpTI) 的免疫金颗粒试剂条的制备方法, 包括: 重新优化CpTI基因密码子, 构建CpTI基因表达序列, 构建CpTI基因和谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 基因融合表达载体, 利用亲和层析柱纯化和切割获得CpTI蛋白, 再将佐剂溶合CpTI蛋白后免疫兔和小鼠, 分别获得抗CpTI多克隆抗体和单克隆抗体, 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 由抗CpTI蛋白单克隆抗体和多克隆抗体通过夹心法获得检测CpTI蛋白的免疫金颗粒试剂条。本发明的有益效果为: 通过夹心法制备胶体金试剂条, 使得检测的特异性大大增加; 能定性检测植株中是否含有CpTI蛋白, 检测最低限为10ng/ml; 本试剂条操作简单, 不污染环境。

```

atgagctg  taagctgtg  ttgctgctg  ctttctctg  taagcttgc  taatcagcc-
atgagctg  acccctctg  aagctatcat  catcttctt  caagcctat  accctctag-
ttctcagac  catctctg  ttctctctc  tgcctctat  caatccctc  tcaatgcat-
ttctcagac  tcaatctg  ttctctctc  tgcctctat  caatccctc  tcaatgcat-
          ↑
          gaa  tgc
ttctcagac  acccctctg  ttctctctc  attctctat  tctctctag  accctctag-
tccagctg  aagctatg  gtaa
  
```