



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110018310 A

(43)申请公布日 2019.07.16

(21)申请号 201910201069.3

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2019.03.18

G01N 33/53(2006.01)

### (83)生物保藏信息

CGMCC No.16696 2018.11.08

CGMCC No.16695 2018.11.08

(71)申请人 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 金芫军 董美 高进  
张哲

(74)专利代理机构 北京华仲龙腾专利代理事务  
所(普通合伙) 11548

代理人 李静

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

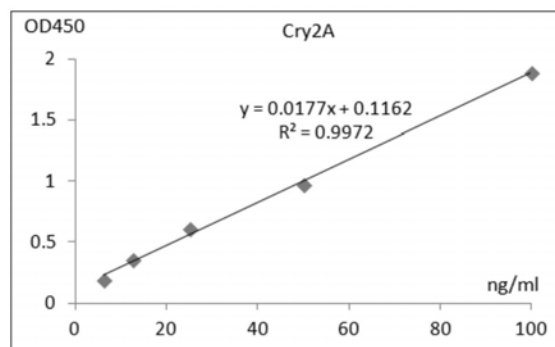
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

### (54)发明名称

定量检测抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒

### (57)摘要

本发明公开了一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A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。本发明的检测方法具有操作简便、能同时快速检测大批样品,具有高灵敏度、高特异性的特点。



1. 一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒包括包被捕获抗体的微孔反应板,所述捕获抗体由保藏号为CGMCC No.16696的杂交瘤细胞株1D11-1A5分泌得到,或者由保藏号为CGMCC No.16695的杂交瘤细胞株2G4-1B8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虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括样品处理液、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。

3. 根据权利要求2所述定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒,其特征在于,

所述样品处理液的配方为: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;

所述生物素标记的检测抗体为100μg/mL生物素标记的Cry2A 2G4-1B8鼠单抗(PBS,50%甘油)溶液;

所述标准品为100ng的His-Cry2A重组蛋白;

所述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;

所述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%BSA 1g,0.05%的吐温20 0.05mL,0.1%的NaN<sub>3</sub> 0.1mL,最终用1×PBS定容至100mL;

所述浓缩洗涤液为含有1.0%Tween-20的10×PBS;

所述底物溶液为0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液,10mL底物缓冲液,32μL 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合,现用现配;

所述终止液为1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

4. 一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将样品处理液、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,在每孔中加入标准品或待测样本进行温育,然后弃去液体,甩干后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,洗涤甩干后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,洗涤甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,混匀在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度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所述的检测方法,其特征在于,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液用生物素标记的抗体稀释液按1:100倍进行稀释得到的。

6. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,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。

7. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本80-120 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50 $\mu$ L,终止反应。

8. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液100 $\mu$ 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 $\mu$ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 $\mu$ L。

9. 根据权利要求4所述的检测方法,其特征在于,所述检测方法为ELISA双抗体夹心方法。

## 定量检测抗虫蛋白Cry2A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,具体涉及到一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种广泛存在的革兰氏阳性菌,该菌分泌的抗虫晶体蛋白是目前主要的生物农药;分泌的抗虫蛋白按照氨基酸序列相似性被分为两类:Cry和Cry $\delta$ -内毒素。其中Cry蛋白对多种有害昆虫(如鳞翅目,双翅目,鞘翅目,线虫类和原生生物等)幼虫具有毒性。Cry毒素已经被转入多种农作物使其具有抗虫性。Cry2A蛋白是Cry毒素中的一种。目前转Cry基因的农作物主要有玉米、土豆、水稻、棉花等。

[0003] 转基因技术的发展与进步推动了生物学的发展。转基因食品虽然能够满足人们对产量、抗虫性等方面的要求,但同时也对人类的生活带来了一些潜在的威胁,如某些基因导入宿主之后会使食品产生毒性,转基因食物产生过敏原,使人产生抗药性,食品的营养价值发生改变等。在进行转基因食品研究开发和商业化的同时,为了对转基因食品的安全性给予综合评估,使消费者能够快速区分转基因食品与天然食品,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安全管理,保障人和动物以及微生物的安全,同时能够保护生态环境,促进农业转基因生物技术的进一步研究。为了对转基因作物或者其衍生物中Cry2A蛋白进行快速的定量分析,研究开发Cry2A酶联免疫试剂盒具有非常大的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒及其检测方法,其具有操作简便、能同时快速检测大批样品,具有高灵敏度、高特异性的特点。

[0005] 一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒,所述酶联免疫试剂盒包括包被捕获抗体的微孔反应板,所述捕获抗体由保藏号为CGMCC No.16696的杂交瘤细胞株1D11-1A5分泌得到,或者由保藏号为CGMCC No.16695的杂交瘤细胞株2G4-1B8分泌得到。

[0006] 所述试剂盒还包括样品处理液、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。

[0007] 所述样品处理液的配方为:1M Tris,pH 7.5 500 $\mu$ L,1M NaCl 1.5mL,0.5M EDTA 20 $\mu$ L,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50 $\mu$ L的1mM苯甲基磺酰氟;

[0008] 所述生物素标记的检测抗体为100 $\mu$ g/mL生物素标记的Cry2A 2G4-1B8鼠单抗(PBS,50%甘油)溶液;

- [0009] 所述标准品为100ng的His-Cry2A重组蛋白；
- [0010] 所述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；
- [0011] 所述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%BSA 1g,0.05%的吐温20 0.05mL,0.1%的NaN<sub>3</sub> 0.1mL,最终用1×PBS定容至100mL；
- [0012] 所述浓缩洗涤液为含有1.0%Tween-20的10×PBS；
- [0013] 所述底物溶液为0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液,10mL底物缓冲液,32μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合,现用现配；
- [0014] 所述终止液为1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。
- [0015] 一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫检测方法,包括以下步骤:
- [0016] 1) 将样品处理液、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；
- [0017] 2) 分别设标准品孔、待测样本孔,在每孔中加入标准品或待测样本进行温育,然后弃去液体,甩干后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,洗涤甩干后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,洗涤甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,混匀在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度OD值；
- [0018] 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。
- [0019] 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液用生物素标记的抗体稀释液按1:100倍进行稀释得到的。
- [0020] 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。
- [0021] 在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本80-120μL,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37℃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80-120μL,覆上新的板贴,37℃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,150-250μL/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液80-120μL,覆上新的板贴,37℃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,150-250μL/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90μL,37℃避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50μL,终止反应。
- [0022] 在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本100μL,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37℃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100μL,覆上新的板贴,37℃温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200μL/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液100μL,覆上新的板贴,37℃温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200μL/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90μL。
- [0023] 所述检测方法为ELISA双抗体夹心方法。
- [0024] 本发明提供的杂交瘤细胞株2G4-1B8和杂交瘤细胞株1D11-1A5,已依次于2018年11月08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

区北辰西路1号院3号。邮编:100101,保藏编号依次为CGMCC No.16696和CGMCC No.16695。

[0025] 本发明的有益效果:本发明的试剂盒采用自主研发筛选的杂交瘤细胞株1D11-1A5和2G4-1B8,分泌得到捕获抗体,基于ELISA双抗体夹心方法检测,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虫蛋白Cry2A的试剂盒。

#### 附图说明

[0026] 图1是本发明的酶联免疫检测方法标准曲线建立。

#### 具体实施方式

[0027] 下面结合附图,对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

[0028] 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。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。

[0029] 实施例1定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒准备

[0030] 酶联免疫试剂盒包括包被捕获抗体的微孔反应板,所述捕获抗体由保藏号为CGMCC No.16696的杂交瘤细胞株1D11-1A5分泌得到,或者由保藏号为CGMCC No.16695的杂交瘤细胞株2G4-1B8分泌得到。

[0031] 试剂盒还包括样品处理液、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。

[0032] 样品处理液的配方为: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;

[0033] 生物素标记的检测抗体为100μg/mL生物素标记的Cry2A 2G4-1B8鼠单抗(PBS,50%甘油)溶液;

[0034] 标准品为100ng的His-Cry2A重组蛋白;

[0035] 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;

[0036] 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%BSA 1g,0.05%的吐温20 0.05mL,0.1%的NaN<sub>3</sub> 0.1mL,最终用1×PBS定容至100mL;

[0037] 浓缩洗涤液为含有1.0%Tween-20的10×PBS;

[0038] 底物溶液为0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液,10mL底物缓冲液,32μL30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>混合,现用现配;

[0039] 终止液为1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0040] 实施例2酶联免疫试剂盒定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A

[0041] 标准品从12.5ng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进行温育,然后弃去液体,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,甩干后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,甩干后每孔加入底物溶液,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6.25g/mL-100ng/mL,推出样品浓度计算公式: $x = (y - 0.1162) / 0.0177$ 。

[0042] 取转基因水稻叶片,经液氮研磨,与样本提取液充分混均,冰上静止30min后取上清,适当稀释后,按照本专利所述的检测方法在每孔中加入标准品进行温育,然后弃去液体,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,甩干后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,甩干后每孔加入底物溶液,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,计算出转基因水稻叶片中,Cry2A的含量 $x = 10.59 \pm 1.87 \mu\text{g/g}$ 。

[0043] 操作要点:

[0044] 1、为保证检测结果的准确性,建议标准品及样本均设双孔测定。每次检测均需做标准曲线。

[0045] 2、如标本中待测物质含量过高,请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。

[0046] 3、加样:加样时,请使用一次性的洁净吸头,避免交叉污染。加样时应尽量轻缓,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。

[0047] 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 $37^\circ\text{C}$ ,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。

[0048] 5、洗涤:洗涤过程非常重要,不充分的洗涤易造成假阳性。

[0049] (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 $200\mu\text{L}$ /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。

[0050] (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。

[0051] 6、显色:为保证实验结果的准确性,底物反应时间到后应尽快加入终止液。可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。

[0052] 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。

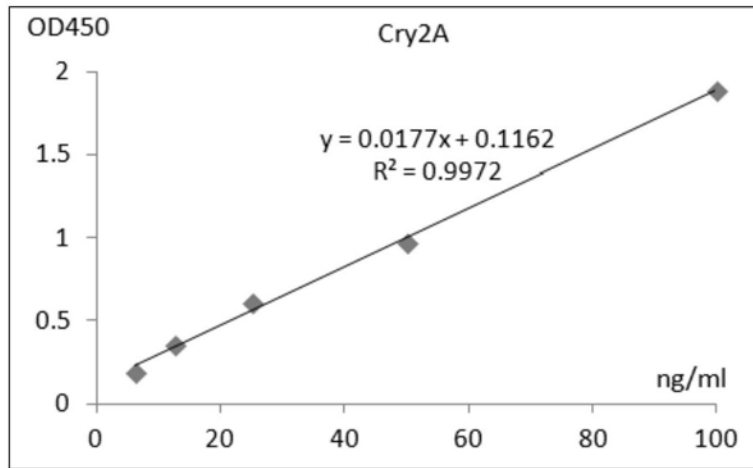


图1

专利名称(译)	定量检测抗虫蛋白Cry2A的酶联免疫试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110018310A</a>	公开(公告)日	2019-07-16
申请号	CN201910201069.3	申请日	2019-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院生物技术研究所		
[标]发明人	刘卫晓 金芜军 董美 高进 张哲		
发明人	刘卫晓 金芜军 董美 高进 张哲		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/535 G01N33/68		
代理人(译)	李静		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry2A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。本发明的检测方法具有操作简便、能同时快速检测大批样品，具有高灵敏度、高特异性的特点。

