

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/558

G01N 21/00

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510040546.0

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1700004A

[22] 申请日 2005.6.13

[21] 申请号 200510040546.0

[71] 申请人 安徽农业大学

地址 230036 安徽省合肥市长江西路 130 号

[72] 发明人 王清 魏梅生 吴振廷 林华峰

[74] 专利代理机构 安徽省合肥新安专利代理有限责
任公司

代理人 吴启运

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 快速检测转 Bt 基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸

[57] 摘要

一种快速检测转 Bt 基因作物抗用胶体金免疫层析试纸，利用胶体金免疫层析技术在短时间内检测鉴定转 Bt 基因作物的抗性。该试纸条是在硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线，检测线侧贴金标兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体玻璃纤维素膜，质控线侧贴吸水纸。其中检测线为兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体，质控线为羊抗兔 IgG。检测时用碳酸缓冲液为样品缓冲液，加入体积为 150 μ l，若试纸条质控线上出现紫红色为阴性结果，在质控线和检测线均出现紫红色者则为阳性结果。本发明操作极其简便，检测周期非常短，特别适合基层部门及野外作业。

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

1、一种快速检测转 Bt 基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸，包括底层和密封胶带，在底层上固定有硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜和吸水纸，其特征在于：在硝酸纤维素膜上包被有相间的两条线，一条由兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体形成的检测线，另一条是由羊抗兔抗体形成的质控线；在检测线一侧压边连接有玻璃纤维素膜，该膜上浸渍有胶体金标记兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体；在质控线一侧压边连接有吸水纸，压边宽 1~2mm。

快速检测转 Bt 基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸

一、技术领域

本发明涉及一种检测用试纸，特别涉及检测转 Bt 基因作物抗性用的试纸，确切地说是一种快速检测转 Bt 基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸。

二、背景技术

转 Bt 基因作物是有效防治作物虫害的有效途径之一，而且有利于保护环境，维护生态平衡。目前，转 Bt 基因棉花（抗虫棉）已大规模种植，至 1999 年，全国累计推广种植抗虫棉达 238 万亩（贾士荣，郭三堆，安道昌，2001 转基因棉花北京；科学出版社）。已研制成功或正在研制的转 Bt 基因作物和植物有水稻、玉米、杨树等。

转 Bt 基因作物抗性的检测是转 Bt 基因作物的研究、选育和种子生产的重要环节，对保证种质纯度有重要意义。国内外已对转 Bt 基因棉的抗性鉴定方法进行了大量的研究，提出了用 ELISA 法检测转 Bt 基因棉中 Bt 毒蛋白的含量（Benedict J H. Field performance of cottons expressing transgenic Cry IA insecticidal proteins for resistance to *Helicoverpa zea* (Lepidoptera; Noctuidae)[C]. *J. Econ. Entomol.*, 1996, 89: 230-238; Sachs E S, Benedict J H, Stelly D M, et al. Expression and segregation of genes encoding Cry IA insecticidal proteins in cotton[J]. *Crop Sci.*, 1998, 38(1): 1-11; 陈松，吴敬音，程德荣，等。转 Br 基因棉 Bt 毒蛋白的 ELISA 检测方法研究(英文)[J]. *棉花学报*, 1999, 11(5): 259-267), 应用标记基因法检测转 Bt 基因棉的纯度(SUN Jing, TANG Can-ming, YUAN Xiao-ling, et al. Selection technique for transgenic Bt cotton using Kanamycin as an indirect identification marker[J]. *Acta Gossypii Sinica*, 2000, 12(5): 270-276; 王坤波，张香娣，刘方等，子叶期卡那霉素快速鉴定转基因棉花[J]. *中国棉花*, 2000, 27(12): 20-21; 祝建波，王爱英，吴刚等，转基因棉花的田间筛选技术研究[J]. *棉花学报*, 2000, 12(5): 230-233; 马丽华，许红霞，胡育昌，转 Bt 基因棉卡那霉素田间快速检测法[J]. *中国棉花*, 2000, 27(2): 11-12), 以及采用田间自然发虫、网室接虫和室内生物测定（郭香墨，转 Bt 基因抗虫棉育种策略与效果[J]. *棉花学报*, 1997, 9(5): 230-235; 董双林，文绍贵，王月恒，棉

铃虫幼虫对转基因棉的存活、生长及危害的影响[J],棉花学报, 1997, 9 (4): 176-182; 杨雪梅, 王武刚, 郭予元等, 转 Bt 基因棉花抗棉铃虫的鉴定技术及其应用[J],植物保护, 1997, 23 (4): 3-5; 曹美莲, 刘惠民, 许琦等, Bt 棉抗铃虫鉴定技术及抗虫性指标划分初探, 中国棉花, 1998, 25 (1): 20-21) 等方法进行转 Bt 基因棉抗虫性的鉴定。但这些方法都存在检测周期长, 操作复杂等局限性。

三、发明内容

检测转 Bt 基因作物的抗性在本发明中就是检测作物中 Bt 基因所表达的 Bt 毒蛋白(抗原), 选择能与 Bt 抗原有高亲和力相结合的抗体作为试剂并使之显色是快速检测的最佳途径。

本发明使用电泳纯 Bt 毒蛋白, 通过家兔制备兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体(下简称兔抗(Bt)), 同时用胶体金溶液对兔抗(Bt)予以标记得到胶体金标记兔抗(Bt)(下简称金标兔抗(Bt))。本发明的技术方案是将检测试剂固定在试纸上, 利用胶体金免疫层析技术实现快速检测的目的。

本试纸包括底层和密封胶带, 在底层上固定有硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜和吸水纸, 其特征是在硝酸纤维素膜上有相间的两条线, 一条是由兔抗(Bt)形成的检测线, 另一条是由羊抗兔 IgG 形成的质控线; 在检测线一侧压边连接有玻璃纤维素膜, 该膜上浸渍有金标兔抗(Bt); 在质控线一侧压边连接有吸水纸, 压边宽 1~2mm。

检测的方法是取出试纸, 将玻璃纤维素膜一端插入待测试样中, 10~20min 后, 观察试纸显色情况并判断:

(1)、仅质控线出现紫红色者为阴性结果, 表示 Bt 基因未转移至作物中; 或者虽然转移, 但未表达 Bt 毒蛋白;

(2)、在检测线和质控线均出现紫红色者为阳性结果, 表示 Bt 基因已转移至作物中并表达出 Bt 毒蛋白;

(3)、若试纸上无紫红色线出现, 说明此试纸已失效。

利用胶体金免疫层析试纸法鉴定转 Bt 基因作物的抗性, 操作十分简便, 不需要任何仪器设备, 也无需操作人员经过特殊的培训, 普通人也可以熟练地操作, 同时其检测灵敏度较高, 检测周期很短, 适合基层单位, 个人及野外操作。可用于检测转 Bt 基因棉花, 转 Bt 基因水稻, 转 Bt 基因玉米, 转 Bt 基因杨树等转 Bt 基因作物、植物的抗性。

四、具体实施方式

(一)、试剂的制备

1、兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体的制备

取 *Bacillus thuringiensis vari.Kurstaki* HK-73 进行培养, 然后提取 Bt 前毒蛋白, 用胰蛋白酶水解, 经 Sephadex G-100 凝胶过滤柱层析分离得电泳纯 Bt 毒蛋白。

将 Bt 毒蛋白注入家兔体内, 自兔抗血清中提取、分离得到兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体 (兔抗 (Bt))。

2、胶体金标记兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体的制备

取四氯金酸制备胶体金溶液, pH7.2~7.5, 金颗粒大小 20~30nm。将兔抗 (Bt) 加入胶体金溶液中, 混合均匀, 即得胶体金标记兔抗 Bt 毒蛋白多克隆抗体 (金标兔抗 (Bt))。

3、自市场上购得羊抗兔抗体 (简称羊抗兔 IgG)。

(二)、试纸的制备

取硝酸纤维素膜 (Millpore 产品), 用点膜仪喷制相间的检测线和质控线, 检测线即是兔抗 (Bt), 质控线即是羊抗兔 IgG; 凉干后置封闭液中封闭处理, 然后取出洗涤、晾干, 粘贴在底层上; 在检测线一侧压边粘贴玻璃纤维素膜, 该膜上浸渍有金标兔抗 (Bt); 在质控线一侧压边粘贴吸水纸, 压边宽 2mm。用黄色胶带复盖玻璃纤维素膜和吸水纸, 用切割器切成 4mm 宽的条带, 置干燥器内 4℃ 下密封保存备用。

(三)、转 Bt 基因作物抗性的检测方法

以转 Bt 基因棉花为例, 非限定实施例叙述如下:

取转 Bt 基因棉花苗期嫩叶 3~5 片, 粉碎后置于 150 μ l 0.05M、pH9.5 的碳酸缓冲液, 搅拌均匀后, 离心分离, 取其上清液。

自干燥器内取出一条试纸, 恢复到室温, 将玻璃纤维素膜的一端插入试样内, 10~20min 后取出, 观察显色情况。

质控线出现紫红色者为阴性。

质控线和检测线均出现紫红色者为阳性结果。

无紫红色线出现, 说明试纸已经失效。

专利名称(译)	快速检测转Bt基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸		
公开(公告)号	CN170004A	公开(公告)日	2005-11-23
申请号	CN200510040546.0	申请日	2005-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽农业大学		
[标]发明人	王清 魏梅生 吴振廷 林华峰		
发明人	王清 魏梅生 吴振廷 林华峰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N21/00 G01N33/531		
代理人(译)	吴启运		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种快速检测转Bt基因作物抗性用胶体金免疫层析试纸，利用胶体金免疫层析技术在短时间内检测鉴定转Bt基因作物的抗性。该试纸条是在硝酸纤维素膜上包被检测线和质控线，检测线侧贴金标兔抗Bt毒蛋白多克隆抗体玻璃纤维素膜，质控线侧贴吸水纸。其中检测线为兔抗Bt毒蛋白多克隆抗体，质控线为羊抗兔IgG。检测时用碳酸缓冲液为样品缓冲液，加入体积为150μl，若试纸条质控线上出现紫红色为阴性结果，在质控线和检测线均出现紫红色者则为阳性结果。本发明操作极其简便，检测周期非常短，特别适合基层部门及野外作业。