

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/543

G01N 33/532



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03113049.6

[45] 授权公告日 2005 年 11 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1226626C

[22] 申请日 2003.3.25 [21] 申请号 03113049.6

[71] 专利权人 江苏省农业科学院经济作物研究所  
地址 210014 江苏省南京市孝陵卫钟灵街 50 号

[72] 发明人 陈 松 周宝良  
审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 南京众联专利代理有限公司  
代理人 谢振龙

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 金标记免疫吸附法检测转 Bt 基因抗虫棉

[57] 摘要

一种金标记免疫吸附法检测转 Bt 基因抗虫棉属于转 Bt 基因抗虫棉的检测方法。本方法是以硝酸纤维素膜为固相载体，将待测样品固定在硝酸纤维素膜上，用兔抗 Bt 毒蛋白抗体与膜上的 Bt 毒蛋白特异性反应，其特点是再用生物素标记的羊抗兔抗体与膜上的 Bt 毒蛋白特异性反应，最后再利用胶体金标记的链霉亲和素蛋白与标记羊抗兔抗体的生物素分子之间的高度亲和反应显示结果。因此，本方法具有灵敏度高，特异性强，操作简单，无需特殊设备，判断直观，非常适合对大量样品的检测。

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

一种金标记免疫吸附法检测转Bt基因抗虫棉的方法，是以硝酸纤维素膜为固体载体，将待测样品固定在硝酸纤维素膜上，用兔抗Bt毒蛋白抗体与样品中固定在硝酸纤维素膜上的Bt毒蛋白发生特异性亲和反应，之后，再用生物素标记的羊抗兔抗体之抗体与兔抗Bt毒蛋白抗体进一步发生特异反应，最后，利用胶体金标记的链霉亲和素蛋白与羊抗兔抗体上所标记的生物素分子之间的高度特异的亲和反应，显示检测结果，其特征在于：利用生物素标记的羊抗兔抗体之抗体与兔抗Bt毒蛋白抗体之间以及胶体金标记的链霉亲和素蛋白与羊抗兔抗体上所标记的生物素分子之间的高度特异的亲和反应，将被检测分子的信号通过逐级放大，最终根据胶体金特有的红色斑点的有无和颜色的深浅判断结果；待测样品制备是，称取新鲜的叶片或吸涨的种子，按1：5(W/V)比例加入10mM PH9.5的碳酸盐缓冲液，研磨成匀浆，10000rpm离心15分钟，取上清液，加等体积的低碳醇有机溶剂，充分混合，离心同上，取下层清液备用。

## 金标记免疫吸附法检测转 Bt 基因抗虫棉

### 技术领域

本发明的金标记免疫吸附法检测转 Bt 基因抗虫棉属对转 Bt 基因抗虫棉的检测方法。

### 背景技术

迄今对转 Bt 基因抗虫棉的鉴定方法有多种，常用的有生物测定法和抗生素抗性鉴定法（也称：卡那霉素间接鉴定法）。

生物测定法，是以转基因棉花叶片等器官直接或掺入昆虫饲料中饲喂昆虫幼虫，通过观察昆虫的死亡率（或成活率）、生长发育来评价转基因棉花的抗虫效果。这种方法，对于评价转基因抗虫棉花的抗虫效果，仍然具有重要意义，但需统一虫源、虫龄，统一饲养条件，试验占用空间大，测定所需时间长，对大量样品，进行测定工作量大，并且饲养过程中易被病毒感染。

抗生素抗性鉴定法的原理是基于转基因 Bt 基因抗虫棉含有一个或多个抗生素抗性基因，如 NPT-II 基因（新霉素磷酸转移酶 II 基因）。这类基因通常与 Bt 基因融合在一起，共转化棉花，便于对转基因棉株的早期筛选。NPT-II 基因的存在使得棉花对卡那霉素产生一定的抗性。主要表现为转基因棉花能在含卡那霉素的培养基中正常生长，而非转基因棉花在含卡那霉素的培养基中则黄化，最后死亡。后来人们发现经 NPT-II 基因转化的棉花，其叶片上涂上 1000ppm-5000ppm 的卡那霉素，叶片无黄斑，而对照棉则出现黄斑。根据这个现象，人们发展出了转基因抗虫棉快速鉴定法，应用该方法可以对 Bt 基因抗虫棉进行鉴定和纯度鉴定。但是近来研究发现，Bt 基因与卡那霉素抗性基因存在不同步转育现象，即表现出卡那霉素抗性的棉株未必抗虫；反之，抗虫的未必一定表现出卡那霉素抗性。因此，应用卡那霉素抗性筛选鉴定抗虫棉也应和生物测定法结合起来，结果更加可靠。

育种家们在实践中还发现 Bt 基因抗虫棉株形态与常规棉有所不同，尤其在苗期表现明显。转 Bt 基因抗虫棉苗期一般表现为子叶叶色深绿、皱摺大；真叶叶小，色深，叶脉清晰；生长势较弱等。然而并非所有的转基因抗虫棉都有此类形态特征。因此，根据形态学鉴定抗虫棉最好与抗虫性调查结合起来。

总之，转 Bt 基因抗虫棉的检测方法很多，各有其特点。没有一种方法是完美无

缺的。

#### 发明内容

本发明的目的在于针对现有技术的现状，提供一种具有灵敏度高，特异性强，操作简便，无需特殊设备，判断测定结果比较直观，适合对大量样品进行检测的方法。

为实现上述发明目的，本发明的金标记免疫吸附法检测转 Bt 基因抗虫棉，是以硝酸纤维素膜为固相载体，将待测样品固定在硝酸纤维素膜上，经过封闭液封闭硝酸纤维素膜上未结合样品蛋白的多余的位点后，用兔抗 Bt 毒蛋白抗体与固定在硝酸纤维素膜上的 Bt 毒蛋白特异性反应，如果样品中可能存在有 Bt 毒蛋白，那么兔抗 Bt 毒蛋白抗体将与之发生抗体抗原特异性结合反应而被固定在硝酸纤维素膜上；如果样品液中没有 Bt 毒蛋白，经过清洗后，硝酸纤维素膜上将不会有抗 Bt 毒蛋白抗体存在；然后再用生物素标记的羊抗兔抗体与固定在硝酸纤维素膜上的 Bt 毒蛋白兔抗抗性特异性反应，该抗体可以特异性地结合膜上通过 Bt 毒蛋白而被固定下来的兔抗体；清洗后，最后利用胶体金标记链霉亲和素蛋白与膜上标记羊抗兔抗体的生物素分子高度亲和反应显示其检测结果。阳性结果出现红色斑点，阴性结果无斑点出现。

胶体金溶液是指分散相粒子直径在 1-150nm 之间金溶胶，属于多相不均匀体系，颜色呈桔红色到紫红色。胶体金能稳定又迅速地吸附蛋白质，而蛋白质的活性无明显改变，因此，可以作为探针进行细胞表面和细胞内多糖、蛋白质、多肽、抗原、激素、核酸等生物大分子的精确定位。固相载体上的斑点免疫金染色法，用胶体金标记代替酶标记，直接利用胶体金本身所具有的颜色来显示抗原或抗体的存在，省却加底物显色的步骤，从而简化了检测步骤。因此，本检测方法将生物素与链霉亲和素之间的高度亲和特性与兔抗 Bt 毒蛋白抗体高度特异性有机结合起来，形成的方法具有灵敏度高，特异性强的优点。并且金标记免疫吸附法的所有反应均在膜上进行，无需特殊设备，测定结果是根据红色斑点的有无作出判断，比较直观，非常适合对大量样品的检测。

#### 具体实施方式：

1、材料：本发明采用的材料有：氯金酸、硝酸纤维素膜（NC 膜）、链霉亲和素、生物素标记羊抗兔抗体。以上材料均为购置物。

2、胶体金制备采用柠檬酸三钠还原法：取 100ml 1% $\text{HauCl}_4$  溶液置于 300ml 三角瓶中，加热沸腾，加入 1%柠檬酸三钠液 2.5ml，边加边搅拌，溶液颜色由浅蓝——紫——酒红，持续加热 15Min，室温冷却，加纯水恢复至原体积，避光保存。用紫外

分光光度计质量鉴定。

### 3、金标记链霉亲和素的制备。

#### (1) 胶体金标记链霉亲和素的最适 PH 值。

采用目测法，即：取 8 个 1.5ml 的 Ependorf 管，分别加入 1ml 15nm 的胶体金，用  $0.2\text{MK}_2\text{CO}_3$  将 PH 值分别调为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5。取一 96 孔酶标板，按 PH 从高到低分别将上述胶体金各取 100ul 加入孔中，每个 PH 值点重复三次，每孔加 10ul，浓度为 0.4mg/ml 的链霉亲和素蛋白，混合，室温下放置 15min，每孔加 20ul 浓度为 10%的 NaCl 溶液，混合，室温下放置 2 小时，观察胶体金颜色的变化。

#### (2) 胶体金标记链霉亲和素的最适蛋白量。

采用比色法，即：将链霉亲和素蛋白溶液稀释成一系列浓度梯度，各取 10ul 加到 100ul 调到最适 PH 值的胶体金溶液中去，使得最终的链霉亲和素蛋白浓度分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50ug/ml，另设一不加蛋白的对照管，5 分钟后，加入 10ul 10%NaCl 溶液，混匀，室温静置 2 小时，观察颜色的变化。能使胶体金稳定的最适蛋白量再加 10%既为最佳标记蛋白量。

#### (3) 胶体金探针制备与纯化。

取 10—15nm 胶体金 20ml 于三角瓶内，三角瓶预先用 GelRepel 溶液处理，以减少胶体金在瓶壁上的附着。用  $0.2\text{MK}_2\text{CO}_3$  标定 PH 到 7.0（最佳）放在磁力搅拌器上。另取 0.5mg/ml 链霉亲和素（0.005MpH9.0 硼酸盐溶解）800ul。在搅拌过程中缓缓加入链霉亲和素蛋白，4℃下搅拌过夜。加 3%PEG (NW2000) 或 BSA，至终浓度为 1%，搅拌 30min 后取出。用 0.22um 微孔滤器膜对标记物进行超滤。再  $1200r4^\circ\text{C}$  离心 15min。取上清，弃沉淀，再  $12800g4^\circ\text{C}$  离心 50min。尽量吸走上清，用 0.02MpH7.4 硼酸盐 Buffer 纯化液稀释至原体积。重复上述步骤一次。雾状沉淀用纯化液稀释到原体积 1/10。4℃避光保存。使用时将其稀释至 OD525nm 读数为 0.5。

4、Bt 毒蛋白的纯化及其抗体的制备参考陈松等方法（江苏农业学报 1999 年，第 15 卷，第 4 期，203—205 页）具体步骤如下：

#### (1) Bt 晶体蛋白的制备

将冷冻 Bt 菌种 HD—1 接种在 LB 液体培养基上，30℃复苏 48h，然后以平推法将菌液涂布在固体 LB 培养基上，37℃保温，培养约 3—4d，至芽孢和晶体分离（石炭酸复红染色法显微镜观察）。

采用液体双相分离法初步分离晶体蛋白。所用的两种液体为 1%硫酸钠水溶液与四氯化碳。具体的操作步骤如下：

- 1) 收集菌，四层纱布过滤；
- 2) 超声波破碎菌液，共 5 次，每次 15 秒。破碎过程注意冷却；
- 3) 12, 500g 离心 15min 去上清，沉淀用蒸馏水和生理盐水各洗一次并分别离心，收集沉淀物；
- 4) 将洗好的沉淀物悬浮于蒸馏水中，配成每毫升含菌 0.07 克（湿重）的悬液，用磁力搅拌器搅拌，去掉液面上的泡沫，其中含有大量芽孢及较少的晶体与营养体碎片，重复多次，直至不再产生泡沫；
- 5) 将去掉泡沫的悬浮液倒入分液漏斗，加入 1%—硫酸钠水溶液与四氯化碳（悬浮液：1%硫酸钠水溶液：四氯化碳=7：6：7〈体积比〉），剧烈振荡 15min，室温静置过夜，取上层水相；
- 6) 12, 500g 离心 15min，沉淀物即晶体蛋白；
- 7) 将沉淀物用双蒸水洗一次，离心（转速同上），然后将沉淀物冷冻干燥后于-20℃下保存。将所得到的晶体制剂在冷冻干燥前取数个样品加蒸馏水稀释，在显微镜下检，晶体纯度在 90%以上。

#### (2) 苏云金杆菌晶体蛋白的酶解及 Bt 毒蛋白的纯化。

- 1) 将 100mg 晶体蛋白溶解于 5ml 0.1M Caps[3—（环己氨基）—1—丙磺酸]buffer(Caps0.1mol/L,2- 巯基乙醇 10mmol/L,pH10.5), 加入胰蛋白酶 (1mg/ml)，使其终浓度约为 10mg/L。轻轻搅拌，20℃×12h；
- 2) 溶液于 10000g×0.5h，4℃条件下离心后，弃沉淀。在 4℃条件下向上清中缓缓加入 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，边加边搅拌，使其终浓度为 40% (W/V)。过夜。
- 3) 溶液于 10000g×0.5h，4℃条件下离心后，弃上清，留沉淀。将沉淀悬浮于蒸馏水中，用截留值为 50kDa 的透析袋，在 4℃条件下对蒸馏水进行充分透析。收集沉淀。
- 4) 将沉淀溶解于 PH9.5 的碳酸盐缓冲液后，过 sephadexG-100 柱，收集主峰蛋白。
- 5) 用 SDS-PAGE 法测定主峰蛋白的分子量（约为 67kDa）。

(3)、兔抗 Bt 毒蛋白抗体的制备。以纯化的 Bt 毒蛋白为抗原，初次免疫抗原剂量为 1mg，含完全福氏佐剂。两周后加强管 1 次，剂量 1.5mg，三周时在加强一次，剂量 1.5mg。琼脂糖扩散法测血清抗体效价。抗体效价达 32 以上后，采血纯化抗体。

### 5、待测样品制备及稀释倍数的确定

称取新鲜的叶片或吸涨的种子，按 1: 5 (W/V) 比例加入样品提取液。研磨成匀浆，10000rpm 离心 15 分钟。取上清液，加等体积的低碳醇有机溶剂，充分混合，离心同上，取下层清液备用。测量时将其稀释 10、20、40 倍，点膜。

### 6、金标记 DIBA 检测步骤

根据需要将 NC 膜切成小块，并用铅笔画出 0.5cm 见方的格子。将待测样品 1-2- $\mu$ l 点在格子中央。于 60—80℃干燥 1—2 小时。之后，将膜放在容器中，加封闭液，室温下，放置 0.5—1 小时。加兔抗 Bt 毒蛋白抗体，4℃下，过夜；之后，用 PBS 磷酸盐缓冲液清洗 5 次，每次 5 分钟；加生物素标记的羊抗兔抗体，室温下放置 1—2 小时；清洗，同上；加适量的胶体金标记的链霉亲和素，室温下显色 30 分钟左右。检测结果根据红斑的有无和深浅判定。并以纯化的 Bt 毒蛋白作为阳性对照，以非 Bt 棉为阴性对照。

### 7、Bt 毒蛋白抗体、生物素标记羊抗兔抗体适宜浓度的确定

按照上述检测步骤，对 Bt 毒蛋白抗体溶液进行 1: 200、1: 400、1: 600、1: 800 倍稀释；生物素标记羊抗兔抗体参考使用说明按照 1: 100、1: 200、1: 300、1: 400 计 4 个稀释度共 16 种组合。对同一种阳性样品液进行检测。选择最适组合。

### 8、检测灵敏度的确定

将标准 Bt 毒蛋白溶液按照倍比稀释后测定。以检测出斑点的最低浓度为检测极限。

专利名称(译)	金标记免疫吸附法检测转Bt基因抗虫棉		
公开(公告)号	<a href="#">CN1226626C</a>	公开(公告)日	2005-11-09
申请号	CN03113049.6	申请日	2003-03-25
[标]发明人	陈松 周宝良		
发明人	陈松 周宝良		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532 G01N33/543		
其他公开文献	CN1438484A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种金标记免疫吸附法检测转Bt基因抗虫棉属于转Bt基因抗虫棉的检测方法。本方法是以硝酸纤维素膜为固相载体，将待测样品固定在硝酸纤维素膜上，用兔抗Bt毒蛋白抗体与膜上的Bt毒蛋白特异性反应，其特点是再用生物素标记的羊抗兔抗体与膜上的Bt毒蛋白特异性反应，最后再利用胶体金标记的链霉亲和素蛋白与标记羊抗兔抗体的生物素分子之间的高度亲和反应显示结果。因此，本方法具有灵敏度高，特异性强，操作简单，无需特殊设备，判断直观，非常适合对大量样品的检测。