

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510130058.9

[51] Int. Cl.

C07K 17/02 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 100348616C

[22] 申请日 2005.12.12

[21] 申请号 200510130058.9

[73] 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 王保民 俞彩霞 赵 静 李召虎
何钟佩 何素平 刘 威 邓艾兴

[56] 参考文献

CN1260397A 2000.7.19

CN1672049A 2005.9.21

CN1501082A 2004.6.2

CN1465596A 2004.1.7

CN1525173A 2004.9.1

审查员 汪波莉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及应用，其目的是提供一种 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备 Bt 免疫检测试剂盒中的应用。制备 Bt Cry1A 抗体的专用抗原，是将具有序列 SEQ ID No: 1 的氨基酸残基序列的多肽与载体蛋白联结得到。Bt Cry1A 抗体，是用所述专用抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到 Bt Cry1A 抗体。该抗体具有下述优点：1) 具有较高的特异性，检测灵敏度可达 $52.7\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，可用于转 Bt 植物(如棉花、玉米、水稻、烟草等)中毒蛋白的定性、定量分析；2) 制备方法简单，具有工业化生产的可行性。本发明将在转 Bt 植物的生物检测领域发挥重要作用，具有广

- 1、制备 Bt Cry1A 抗体的专用抗原，是将 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸残基序列与载体蛋白采用戊二醛法联结得到的多肽。
- 2、根据权利要求 1 所述的专用抗原，其特征在于：所述载体蛋白联结于所述 SEQ ID NO: 1 的氨基端。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的专用抗原，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白、人血清白蛋白、蛋白匙孔血蓝蛋白或卵清白蛋白。
- 4、Bt Cry1A 抗体，是用权利要求 1-3 任意一项所述的专用抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到的抗体。
- 5、根据权利要求 4 所述的 Bt Cry1A 抗体，其特征在于：所述用于制备 Bt Cry1A 抗体的免疫动物为鸡、兔、鼠、羊或马。
- 6、一种制备权利要求 4 所述的 Bt Cry1A 抗体的方法，其步骤如下：
 - 1) 用权利要求 1 所述的专用抗原免疫动物；
 - 2) 从步骤 1) 经免疫的动物中分离、纯化血清，得到 Bt Cry1A 抗体。
- 7、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 中用于制备 Bt Cry1A 抗体的免疫动物为鸡、兔、鼠、羊或马。
- 8、Bt 免疫检测试剂盒，其活性成分为权利要求 4 所述的 Bt Cry1A 抗体。

一种 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及应用

技术领域

本发明涉及 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及应用，特别是涉及一种 Bt Cry1A 抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备 Bt 免疫检测试剂盒中的应用。

背景技术

转 Bt 植物(棉花、玉米、水稻、烟草)的杀虫机理是由于植物体内表达了毒蛋白。Bt 免疫检测试剂盒主要用于大规模准确检测 Bt 植物毒蛋白的有无及含量的高低，转 Bt 植物的检测方法主要有三种：(1)生物试法；(2)DNA 检测；(3)蛋白的免疫检测。在这三种方法中，生物试法比较繁琐，测定结果变异大，且难以进行横向和纵向的比较。DNA 检测只是检测基因，并不代表蛋白水平，对于抗性的高低并无指导意义。免疫检测方法方便、实用、快速、经济。

Bt 免疫检测试剂盒已广泛应用于转基因抗虫棉花、玉米种子质量检测，真伪鉴定，食品中转基因成分分析，生物安全性的研究。Bt 试剂盒的好坏完全取决于 Bt 杀虫晶体蛋白 Cry1A 抗体的好坏。国内外文献报道中的 Cry1A 抗体，都是通过苏云金芽孢杆菌发酵、提取、纯化的蛋白作为抗原免疫动物得到的。由于蛋白的分离和纯化非常困难，在纯化的过程中不可避免会掺入一些杂蛋白，即使是非常纯化的蛋白，由于多个抗原决定簇的存在，所制备的抗体往往也会有交叉反应，因此抗体的特异性受到影响。为解决抗体的特异性问题，目前国外 Bt 试剂盒中的 Cry1A 抗体是通过合成多肽的方法来制备的，但所利用的是何种多肽大多没有公开或者已申请专利。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一种用于制备 Bt Cry1A 抗体的专用抗原。

本发明所提供的制备 Bt Cry1A 抗体的专用抗原，是将具有序列表中 SEQ ID No: 1 的氨基酸残基序列的多肽与载体蛋白联结得到。

序列表中的 SEQ ID No: 1 由 16 个氨基酸残基组成。肽的合成通常用固相合成法，多采用叔丁氧(酰)羰基(t-BOC)化学法和 9-氟甲氧羰基(FMOC)化学法。

所述载体蛋白联结于所述多肽的氨基端(N端)。

载体蛋白可为任意一种常用的载体蛋白，如牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、蛋白匙孔血蓝蛋白(KLH)或卵清白蛋白(OVA)等。

将多肽与载体蛋白进行联结的方法也是常规的戊二醛法。

本发明的第二个目的是提供一种 Bt Cry1A 抗体。

本发明所提供的 Bt Cry1A 抗体，是用上述专用抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到的抗体。

所述用于制备 Bt Cry1A 抗体的免疫动物可为鸡、兔、鼠、羊或马等常用的免疫动物。

本发明的另一个目的是提供一种 Bt Cry1A 抗体的制备方法。

本发明所提供的 Bt Cry1A 抗体的制备方法，包括以下步骤：

- 1) 用上述专用抗原免疫动物；
- 2) 从步骤 1) 经免疫的动物中分离、纯化血清，得到 Bt Cry1A 抗体。

在上述制备方法中，步骤 3) 中用于制备 Bt Cry1A 抗体的免疫动物可为鸡、兔、鼠、羊或马等常用的免疫动物。

本发明的第四个目的是提供一种 Bt 免疫检测试剂盒。

本发明所提供的 Bt 免疫检测试剂盒，其活性成分为上述 Bt Cry1A 抗体。

在实际应用中，为方便检测，可将阴性血清对照、血清稀释液、洗涤剂、终止剂、显色剂、Bt 标样和 HRP-羊抗兔 IgG 抗体等检测试剂也包装入上述试剂盒。

本发明提供了一种 Bt Cry1A 抗体。该抗体具有下述优点：1) 具有较高的特异性，检测灵敏度可达 $52.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，可用于转 Bt 植物(如棉花、玉米、水稻、烟草等)中毒蛋白的定性、定量分析；2) 制备方法简单，具有工业化生产的可行性。本发明将在转 Bt 植物的生物检测领域发挥重要作用，具有广阔的市场前景。

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

图 1 为 Bt Cry1A 蛋白浓度标准曲线

具体实施方式

下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

实施例 1、Bt Cry1A 抗体的制备

一、Bt 杀虫晶体蛋白 Cry1A 多肽片断的选择和合成

对 GenBank 数据库中 Bt 杀虫晶体蛋白 Cry1A (包括 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac) 基因 (GenBank 号分别为: D17518, X54939, U87397) 所编码的氨基酸序列进行理化分析，从中选择一段特定的由 16 个氨基酸残基 (序列表中的 SEQ ID No: 1) 组成的多肽片段，用固相合成法进行合成，分子量为 1943.14。

二、免疫抗原的制备

将步骤一合成的多肽片段与牛血清白蛋白 (BSA) 采用戊二醛方法进行联结，具

体方法包括以下步骤:

(1) 取 10mg BSA, 完全溶解于 5mL 0.01mol/L PBS 中, 再加入 4mg 步骤一的合成多肽, 使其完全溶解。

(2) 缓慢加入 5mL 0.2% 的戊二醛溶液, 与步骤 (1) 获得的溶液混合, 并在室温下, 搅拌反应 2 小时。

(3) 加入 0.2mL 1M 甘氨酸, 在室温下搅拌 1 小时, 以终止反应。

(4) 将步骤 (3) 获得的溶液装入透析袋中, 用 PBS 透析 4 天进行纯化, 每天换三次透析液。将透析后得到的多肽-BSA 联结物进行分装, 经 -40°C 冷冻后, 真空浓缩干燥, 保存于 -20°C 冰箱中。

三、制备 Bt Cry1A 抗体

免疫动物采用新西兰大耳白兔, 兔龄三个月左右, 体重 2kg 以上。以步骤二制备的多肽-BSA 的联结物作为抗原, 免疫动物, 制备 Bt Cry1A 抗体, 免疫方法及剂量为: 共免疫注射六次, 将抗原用 PBS 稀释至 $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以载体蛋白计算), 然后与等体积的福氏完全佐剂 (第一次免疫) 或福氏不完全佐剂 (第二次至第五次免疫) 混合后乳化, 最后一次用免疫抗原直接免疫, 免疫剂量均为 1mL/兔。第三次免疫后耳缘静脉取血, 检测抗血清效价, 检测结果表明抗血清效价达 1/50000。最后一次免疫后的第七天颈动脉放血, 分离、纯化后得到抗血清, 检测抗血清效价, 检测结果表明抗血清效价达 1/50000, 可用于 Bt Cry1A 含量的检测。

实施例 2、Bt Cry1A 抗体的鉴定及 Bt 蛋白浓度标准曲线的建立

用 ELISA 方法对 Bt Cry1A 抗体进行鉴定, 并绘制出 Bt 蛋白浓度标准曲线, 具体过程包括以下步骤:

(1) 包被 Bt 标准蛋白

将 Bt Cry1A 标准蛋白用包被缓冲液 (1.5g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 , 0.2g NaN_3 , 加 1000mL 蒸馏水, pH 为 9.6) 稀释成五个浓度, 依次为 2640, 880, 293, 97, 32 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以包被缓冲液为空白对照 (即为 0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μl , 每个浓度三次重复, 于 37°C 温箱中温育 3h。弃去孔内液体, 用洗涤液 (8.0g NaCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1 mL Tween-20, 加 1000mL 蒸馏水) 洗板四次后甩干。

(2) 与 Bt Cry1A 抗体反应

将实施例 1 制备的 Bt Cry1A 抗体用样品稀释液 (8.0g NaCl , 0.2g KH_2PO_4 , 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1mL Tween-20, 1g 明胶, 加 1000mL 蒸馏水, pH 为 7.5) 按 1: 500 的比例稀释, 酶标板每孔中加入 100 μl , 放入 37°C 温箱中温育 30min。弃去孔内液体, 用洗涤液洗板四次后甩干。

(3) 与酶标二抗反应

将 HRP-羊抗兔 IgG 抗体 (sigma 公司) 用样品稀释液按 1: 1000 的比例进行稀释, 每孔加 100 μ l, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 30min。弃去孔内液体, 用洗涤液洗板四次, 甩干。

(4) 显色

于酶标板每孔中加入 100 μ l 邻苯二胺 (ortho-phenylene diamine, OPD) 溶液, 常温下显色, 显色充分后用 2N 硫酸终止反应, 用酶标仪测定各孔 492nm 处的 OD 值。

检测结果表明实施例 1 制备的 Bt Cry1A 抗体可与 Bt Cry1A 标准蛋白特异反应, 依据 Bt Cry1A 标准蛋白的浓度梯度及其相应的 OD 值绘制标准曲线, 如图 1 所示 (y 轴为 Bt Cry1A 标准蛋白各浓度的自然对数值, x 轴为其相应的 OD 值), 标准曲线的回归方程为: $y=3.9016x+3.185$, 相关系数 $R^2=0.982$, IC_{50} 为 169.9 $ng\cdot mL^{-1}$, 检测范围为 52.7 $ng\cdot mL^{-1}$ 到 547.8 $ng\cdot mL^{-1}$ 。

实施例 3、转 Bt 棉花杀虫晶体蛋白 Cry1A 的检测

用 ELISA 方法对转 Bt 抗虫棉花中的杀虫晶体蛋白 Cry1A 进行检测, 所用的抗虫棉花品种包括: 中 41、中 45、中 29、GK36、GK12、33B, 以常规棉中 12、中 43 为对照 (中国农科院棉花研究所购买) 具体过程包括以下步骤:

(1) 称取 Bt 转基因棉花样品 0.3g, 加入 3mL PBS 提取液后充分研磨, 提取 4h 后 3000rpm 离心 10min, 取上清液用于分析。

(2) 向酶标板每孔中加入步骤 (1) 获得的上清液 100 μ l, 于 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 3h。弃去孔内液体, 用洗涤液洗板四次, 甩干。

(3) 将实施例 1 制备的 Bt Cry1A 抗体用样品稀释液按 1: 500 的比例进行稀释, 向酶标板每孔中加入 100 μ l, 放入 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 30min。弃去孔内液体, 用洗涤液洗板四次后甩干。

(4) 将 HRP-羊抗兔 IgG 抗体用样品稀释液按 1: 1000 的比例进行稀释, 向酶标板每孔中加入 100 μ l, 置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中温育 30min。弃去孔内液体, 用洗涤液洗板四次, 甩干。

(5) 向酶标板每孔中加入 100 μ l OPD 溶液, 常温下显色, 用 2N 硫酸终止反应, 在酶标仪上测定各孔 492nm 处的 OD 值。

实验结果显示, 转基因棉品种中 41, 中 45, 中 29, GK36, GK12, 33B 明显比常规棉品种中 12 和中 43 显色深。根据实施例 2 绘制的 Bt Cry1A 蛋白浓度标准曲线计算出上述棉花样品中 Bt Cry1A 蛋白的浓度的, 结果如表 1 所示, 表明转基因棉中 Bt Cry1A 杀虫晶体蛋白含量明显高于上述两种常规棉品种, 与显色结果一致。证明用本

发明的 Bt Cry1A 抗体及 ELISA 方法能够有效地区别常规棉和抗虫棉，并且能对其中的 Bt Cry1A 杀虫晶体蛋白含量进行较为准确的测定。

表 1 常规棉和抗虫棉中 Bt 毒蛋白含量

品种	常规棉		转基因抗虫棉					
毒蛋白含量 (ng·mL ⁻¹)	中 12	中 43	中 41	中 45	中 29	GK36	GK12	33B
	0	0	44.6	42.9	29.0	50.3	19.3	52.7

序列表

<160> 1

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu Glu Met

1

5

10

15

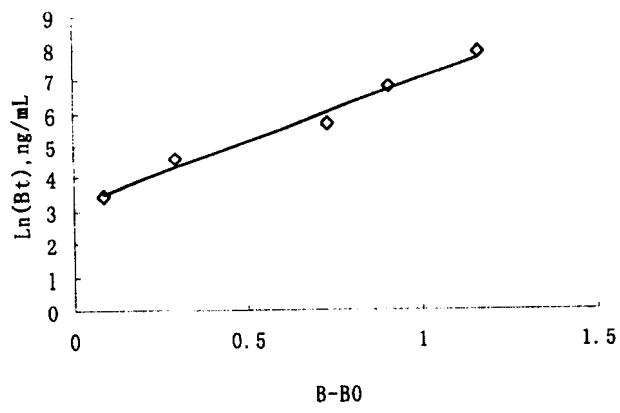


图 1

专利名称(译)	一种Bt Cry1A抗体及其制备方法与专用抗原及应用		
公开(公告)号	CN100348616C	公开(公告)日	2007-11-14
申请号	CN200510130058.9	申请日	2005-12-12
[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	王保民 俞彩霞 赵静 李召虎 何钟佩 何素平 刘威 邓艾兴		
发明人	王保民 俞彩霞 赵静 李召虎 何钟佩 何素平 刘威 邓艾兴		
IPC分类号	C07K17/02 C07K7/08 C07K14/765 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/68		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1775809A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种Bt Cry1A抗体及其制备方法与专用抗原及应用，其目的是提供一种Bt Cry1A抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备Bt免疫检测试剂盒中的应用。制备Bt Cry1A抗体的专用抗原，是将具有序列表中SEQ ID No：1的氨基酸残基序列的多肽与载体蛋白联结得到。Bt Cry1A抗体，是用所述专用抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到Bt Cry1A抗体。该抗体具有下述优点：1)具有较高的特异性，检测灵敏度可达52.7ng·mL⁻¹，可用于转Bt植物(如棉花、玉米、水稻、烟草等)中毒蛋白的定性、定量分析；2)制备方法简单，具有工业化生产的可行性。本发明将在转Bt植物的生物检测领域发挥重要作用，具有广阔的市场前景。

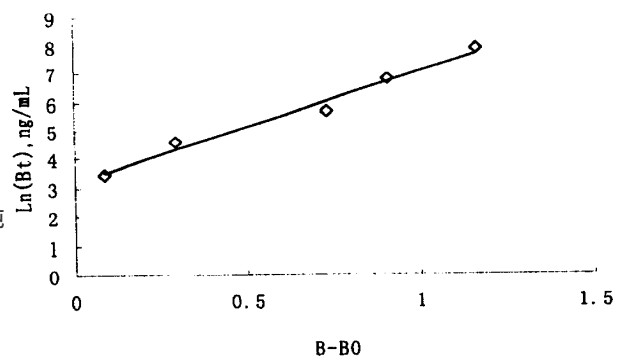


图 1