

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480022707.7

[43] 公开日 2006 年 9 月 13 日

[11] 公开号 CN 1833168A

[22] 申请日 2004.7.2

[21] 申请号 200480022707.7

[30] 优先权

[32] 2003. 7. 7 [33] US [31] 60/485,602

[86] 国际申请 PCT/US2004/021396 2004.7.2

[87] 国际公布 WO2005/014847 英 2005.2.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.7

[71] 申请人 辛根塔参与股份公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 L·蔡托尼

[72] 发明人 M·S·亚内尔 L·蔡托尼

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 程 泳

权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用于检测饲料酶的试剂、方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及免疫学领域并更特定地涉及用于检测蛋白和酶，特别是饲料酶的免疫检测方法、试剂盒和试剂。

1. 用于检测样品中的饲料酶的免疫检测法，所述的方法包括以下步骤：

a) 在存在能免疫识别提取物中的饲料酶的一抗时制备样品提取物，从而形成一抗-饲料酶复合物；

b) 制备具有显著三维尺寸的固相形式，以形成具有多个缝隙空间的显著体积，其上结合有能够免疫识别饲料酶的所需的二抗，其中所述二抗与检测手段缀合，并且其中所述二抗也免疫识别所述饲料酶。

d) 将步骤(a)的提取物和步骤(b)制备的形式混合，由此提取物流过制备的固相形式的缝隙空间，捕获一抗-饲料酶复合物；

e) 通过所述的捕获的一抗-饲料酶复合物的存在来检测饲料酶。

2. 如权利要求1所述的免疫检测法，其中所述的饲料酶是肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和/或蛋白酶蛋白。

3. 如权利要求2所述的免疫检测法，其中肌醇六磷酸酶是热稳定性肌醇六磷酸酶。

4. 如权利要求1所述的免疫检测法，其中所述的固相形式是醋酸纤维素、纤维素、硝化纤维素或尼龙。

5. 如权利要求4所述的免疫检测法，其中所述的固相形式是由多个堆叠和连续的层组成，其中每层能捕获不同的饲料酶。

6. 如权利要求4所述的免疫检测法，其进一步包括固相形式的样品吸收层。

7. 如权利要求6所述的免疫检测法，其进一步包含含有标记的抗-饲料酶抗体的试纸条。

8. 如权利要求1所述的免疫检测法，其中所述的检测手段是胶体金。

9. 用于通过如权利要求1所述的免疫检测法检测的试剂盒，包含：

a) 用于从样品中提取饲料酶的手段; 和

b) 固相形式, 其含有抗饲料酶一抗并具有显著三维尺寸以形成具有多个缝隙空间的显著体积, 其上结合有能够免疫识别饲料酶的所需的二抗, 其中所述二抗与检测手段缀合, 并且其中所述二抗也免疫识别所述饲料酶。

10. 如权利要求 9 所述的试剂盒, 其还含有装有缓冲液的容器。

11. 如权利要求 10 所述的试剂盒, 其进一步包含将样品分散至固相形式上的手段。

12. 用于检测和定量饲料酶的免疫检测法, 所述的免疫检测法包括以下步骤:

a) 制备样品提取物;

b) 将一部分提取物和能与饲料酶结合的抗饲料酶一抗以及和能与饲料酶结合的抗饲料酶二抗孵育来产生抗体-聚合物-抗体复合物, 其中所述的一抗结合至固体载体上;

c) 洗涤抗体-聚合物-抗体复合物以除去未结合的二抗;

d) 加入能与二抗发生免疫反应的检测抗体, 其中检测抗体是标记的; 并

e) 测量结合的或未结合的标记的抗体的量来检测流体中水处理聚合物的浓度。

13. 如权利要求 12 所述的免疫检测法, 其中所述的饲料酶是肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和/或蛋白酶蛋白。

14. 如权利要求 13 所述的免疫检测法, 其中肌醇六磷酸酶是热稳定性肌醇六磷酸酶。

15. 如权利要求 12 所述的免疫检测法, 其中可检测的标记物是酶。

16. 如权利要求 15 所述的免疫检测法, 其中所述的酶是碱性磷酸酶、过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶。

17. 如权利要求 16 所述的免疫检测法, 其中所述的酶产生不可溶的反应产物。

18. 用于通过如权利要求 12 所述的免疫检测法检测和定量的试剂盒，其包含：

- a) 用于从样品中提取饲料酶的手段；
- b) 包含结合至固体支持物上的抗饲料酶一抗的固体支持物；
- c) 抗饲料酶二抗；和
- d) 能免疫性结合至二抗的检测抗体，其中所述检测抗体用检测手段标记。

19. 如权利要求 18 所述的试剂盒，其中所述的检测手段是酶。

20. 如权利要求 19 所述的试剂盒，其中所述的检测酶是碱性磷酸酶、过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶。

21. 如权利要求 20 所述的试剂盒，其中所述的酶产生可溶或不可溶的反应产物。

22. 如权利要求 21 所述的试剂盒，其进一步包含酶的底物。

23. 免疫识别肌醇六磷酸酶的抗体。

24. 如权利要求 23 所述的抗体，其中所述的抗体是多克隆抗体。

25. 如权利要求 23 所述的抗体，其中所述的抗体是单克隆抗体。

用于检测饲料酶的试剂、方法和试剂盒

本申请要求于 2003 年 7 月 7 日申请的美国临时申请案 No. 60/485,602 的申请日的利益, 这里通过全文引用该申请案作为参考。

发明领域

本发明涉及免疫学领域并更特定地涉及用于检测蛋白和酶, 特别是饲料酶的免疫检测方法, 包括 ELISA 和免疫检测试纸(immunostrip) 检测法, 试剂盒和试剂。

发明背景

现在十分需要方便、相对容易的用于检测动物饲料中酶的存在性的检测法。迄今, 没有标准的免疫检测法用于这种检测。

对检测植物是否已经进行了基因改良或者谷物或加工食品是否含有 GMO 特性也有巨大的需求。这种需要要求有能检测和定量新颖的 DNA 或蛋白的测试方法。本发明满足这种需要, 提供用于检测和定量饲料酶的免疫方法、试剂和试剂盒。

发明概述

提供了用于检测和测量样品中的酶的方法、试剂盒和试剂。优选地, 受检测的蛋白包括但不限于一种或多种肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和蛋白酶。蛋白可在不同微生物中产生, 所述微生物包括但不限于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyce pombe*) 和巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia Pastoris*), 或在植物中产生, 所述的植物包括但不限于例如玉米、小麦、水稻、油菜 (canola) 和苜蓿 (alfalfa)。特别地, 蛋白在饲料中或在含有编码该蛋白的基因的基因改良植物中得以检测。饲料是动物饲料。动物饲料可以用于单胃动物或反刍动物。饲料可以是浆状饲料 (mash feed) 和/或丸状饲料。

试剂包括纯化过的蛋白和该蛋白特异性抗体。在优选的实施方案中，蛋白是肌醇六磷酸酶。肌醇六磷酸酶蛋白可以从大肠杆菌包涵体中分离并施用至动物以产生多克隆或单克隆抗体。备选地，蛋白可从可溶细胞提取物如大肠杆菌细胞提取物中分离。

抗体对蛋白具有高度的敏感性和特异性并可用于免疫检测方法检测在动物中或在基因改良生物体中的酶活性蛋白。

方法是免疫检测法，所述免疫检测法采用这里描述的抗体并能检测低浓度的蛋白。抗体经过纯化，因而最低限度地与样品中出现的其它蛋白反应。

将抗体和/或蛋白和用于检测蛋白的常规免疫检测试剂装配在试剂盒内。

提供了用于检测和测量样品中的蛋白的方法、试剂盒和试剂。要进行检测的蛋白包括一种或多种饲料酶，如肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和蛋白酶。蛋白可从多种物种中产生，这些物种包括但不限于大肠杆菌、粟酒裂殖糖酵母和巴斯德毕赤氏酵母。特别地，肌醇六磷酸酶蛋白在动物饲料中和在基因改良的表达目标饲料酶基因如肌醇六磷酸酶基因的植物中检测。

试剂可以包括抗原肽/蛋白和抗体。抗原肽/蛋白能与抗体发生免疫反应。抗原肽/蛋白具有共同表位，所述共同表位是在不同物种中表达的蛋白共有的。分离或合成该肽/蛋白并施用至动物以产生抗体。

对于肌醇六磷酸酶来说，抗体对在不同物种中产生的肌醇六磷酸酶具有高度的敏感性和交叉反应性并因此可用于免疫检测法来检测受到改造而能表达肌醇六磷酸酶基因的基因改良生物体，特别是植物。

方法是采用在这里描述的抗体的免疫检测法并能检测动物饲料中和基因改良的谷物样品中的低浓度肌醇六磷酸酶蛋白。该抗体能与肌醇六磷酸酶基因表达的肌醇六磷酸酶上的表位或共同表位发生免疫反应并最低限度地与样品中出现的其它蛋白反应，因而对样品中如谷物样品中的基因改良的生物体的存在提供精确的检测。

将表位、抗体或两者与传统的免疫检测试剂共同装配于试剂盒内

用于检测蛋白。试剂盒可任选地包含单克隆和多克隆抗体及用于检测样品中蛋白或饲料酶的存在标准品。

从上而知，真的需要发展使得能鉴定样品中的特异性蛋白或饲料酶的技术。

通过下面的详述，本发明的其它目标、特征和优势将变得显而易见。然而应该理解，尽管用来说明本发明的优选实施方案，详述和特定实施例仅是以例证的方式给出，因为从该详述来看在本发明的精神和范围内的各种改变和调整对那些本领域技术人员变得显而易见。

附图简述

图 1 是显示肌醇六磷酸酶活性的标准曲线的曲线图。

图 2 是显示在 ELISA 和酶-活性检测法中在 99℃ 时肌醇六磷酸酶的百分比相对活性-孵育时间的图。ELISA 中的肌醇六磷酸酶的检测与酶活性检测法中检测到的活性在量上一致。

图 3 是免疫检测试纸测试的扫描复制图，显示了在 99℃ 孵育最多一小时后肌醇六磷酸酶的检测值（箭头）。在 99℃ 时约 20 分钟后可看见肌醇六磷酸酶的检测值下降。

图 4 是作为范例的免疫检测法测试试剂盒和使用该试剂盒的方法。

公开的实施方案详述

在这里描述了用于检测样品中的蛋白的方法、试剂盒和试剂。优选地，蛋白是饲料酶，并且更优选地，饲料酶包括但不限于肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和蛋白酶。

本发明方法学可用于检测样品中如动物饲料中的任何酶。许多饲料酶为本领域技术人员熟知。例如，许多肌醇六磷酸酶是已知的，这些肌醇六磷酸酶的检测可用本发明完成。已知的肌醇六磷酸酶包括但不限于在题为“Recombinant Bacterial Phytases and Uses Thereof”的 WO 01/90333 中；在题为“Novel Phytase”的 WO 99/08539；在题为“Microbially Expressed Thermotolerant Phytase For Animal

Feed”的美国专利申请 No.10/333,672 中和题为“Thermotolerant Phytase For Animal Feed”的美国专利申请 No.10/334,671 中所描述的，每个及每个的全部在这里通过全文引用作为参考。

当进行免疫检测来检测转基因植物和由它们产生的产品（包括食物级分）中的蛋白时，测试具有能检测来自不同基因的蛋白的能力是重要的。因而，交叉反应抗体对发展成功的商业产品十分重要。

试剂是具有共同表位的抗原蛋白或肽及与从不同基因表达的蛋白能发生交叉反应的抗蛋白抗体。本方法是用于灵敏、特异性检测蛋白，尤其是用于检测动物饲料中和基因改良的植物中如农产品中的蛋白的免疫检测法。试剂盒含有如这里描述的抗蛋白抗体及其它试剂，特别是那些用于试纸条测试形式的那些试剂，以用于在下面更详细描述免疫检测法。

抗原蛋白

为了制备重组蛋白如肌醇六磷酸酶，转染合适的宿主株并让宿主株生长到合适的细胞密度，例如，细菌、昆虫或酵母宿主，可将选择的启动子通过适当的手段（例如温度转换或化学诱导）进行诱导并将细胞培养另外的一段时期产生重组酶。然后通过离心典型地收获细胞，通过物理或化学手段破裂细胞，并将得到的粗提取物保留用于进一步的纯化。

用来表达蛋白的微生物细胞可通过任何便利的方法破裂，方法包括冻融循环（freeze-thaw cycling）、超声处理、机械破碎或使用细胞裂解剂，这些方法为本领域技术人员熟知。

通过一些方法可以将酶从重组细胞培养物中回收并纯化，方法包括硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。如有必要，可用蛋白重新折叠步骤来获得成熟蛋白的结构。最后，可将高效液相色谱（HPLC）用于最后的纯化步骤。

抗原肽

抗原肽可以是蛋白表面肽，这些肽在表达该蛋白的不同物种中具

有相同表位，优选地，所述的蛋白从不同的微生物中表达。

这些肽作为用于检测和定量蛋白的诊断标记是非常有用的。这些肽也用于产生抗体、测试和具有成功的商业产品必需的优良灵敏性的试剂盒。

在一个实施方案中，肽可以从表达编码蛋白的基因的细胞培养物中用本领域技术人员已知的常规技术如亲和柱纯化分离，或依照本领域已知的方法产生肽的氨基酸序列并合成肽。

具有上面提出的特性的抗原肽可用于产生能与肌醇六磷酸酶发生反应的单克隆或多克隆抗体。

抗体

使用哺乳动物，特别是兔、鸡、小鼠或山羊产生本发明使用的抗体。接种的方案不是关键的并可以是任何一般用于本领域该目的的方案。这种方法步骤在例如 *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998, 92-115 页中描述。

用于检测肌醇六磷酸酶的优选的抗体是通过免疫亲和性纯化的对抗大肠杆菌包涵体中产生的重组肌醇六磷酸酶的兔抗体、鸡抗体和山羊抗体。为了检测和定量肌醇六磷酸酶，优选地直接用包括酶、放射性同位素和染色粒子如乳胶小珠或胶体金的标记物标记抗体。在另外的实施方案中，如通过与结合至抗体如二抗、蛋白 A 或蛋白 G 的被标记的物质反应而间接标记抗体。

多克隆抗体

在一个实施方案中，抗体是多克隆抗体。用于制备多克隆抗体的方法为技术人员所知。可以例如通过一次或多次注射免疫剂，如果需要还包括佐剂，在动物中引起多克隆抗体。通常，通过多次皮下或腹膜内注射将免疫剂和/或佐剂注射至哺乳动物中。免疫剂包括饲料酶或其融合蛋白。例如，该免疫剂是肌醇六磷酸酶多肽或其融合蛋白。在另一方法中，将免疫剂缀合至已知在受免疫的哺乳动物中具有免疫原性的蛋白上。这种免疫原性的蛋白的实例包括但不限于钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。佐剂的实例包

括弗氏完全佐剂和 MPL-TDM 佐剂（单磷酸脂 A、合成的 trehalose dicorynomycolate）。可由本领域技术人员选择免疫方法而不需要过多的试验。优选的抗体可高度灵敏地用于测定饲料酶，所述的饲料酶是例如但不限于肌醇六磷酸酶蛋白，例如在销售渠道中大量商品粮样品中相应浓度的转基因肌醇六磷酸酶蛋白。优选地，该抗体能以约 0.059ng/ml 的高灵敏度检测饲料酶如肌醇六磷酸酶。高灵敏性抗体可用于检测基因改良的农作物组织例如但不限于叶、茎、种子、秆茎、根等或源于这些农作物的产品（例如食物级分）中的低浓度饲料酶如肌醇六磷酸酶蛋白。

单克隆抗体

备选地，抗饲料酶抗体如抗肌醇六磷酸酶抗体是单克隆抗体。使用杂交瘤方法如由 Kohler 和 Milstein, Nature, 256: 495 (1975) 描述的那些方法制备单克隆抗体。在杂交瘤方法中，用免疫剂典型地免疫小鼠、仓鼠或其它合适的宿主动物来诱导淋巴细胞，所述的淋巴细胞产生或能产生特异性结合至免疫剂的抗体。备选地，可在体外诱导淋巴细胞。

免疫剂一般包括所需的多肽或其融合蛋白。通常，如果期望得到人源细胞，可使用外周血液淋巴细胞（“PBLs”），或者如果期望得到非人哺乳动物源的细胞，可使用脾细胞或淋巴结细胞。然后用合适的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与永生化细胞系融合来形成杂交瘤细胞（Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) 59-103 页）。永生化细胞系一般是受转化的哺乳动物细胞，特别是啮齿动物、牛和人源性的骨髓癌细胞。通常，采用大鼠或小鼠骨髓癌细胞系。将杂交瘤细胞在合适的培养基中培养，所述的培养基含有一种或多种抑制非融合的永生化细胞的生长或存活物质。例如，如果亲本细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶（HGPRT 或 HPRT），用于杂交瘤的培养基一般包括次黄嘌呤、氨蝶呤和胸腺嘧啶（“HAT 培养基”），这些物质抑制 HGPRT-缺陷型细胞的生长。

优选的永生化细胞系是能有效融合、支持由选择的产生抗体的细胞稳定而高水平的表达抗体以及对培养基如 HAT 培养基灵敏的那些细胞系。更优选的永生化细胞系是鼠科骨髓瘤细胞系，该细胞系能例如从 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣地亚哥, 加利福尼亚州和美国典型微生物保藏中心 (American Type Culture Collection), 马纳萨斯, 弗吉尼亚州 (Manassas, Va) 获得。人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也在人单克隆抗体的产生中得以描述 (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987, 51-63 页)。

然后检测培养杂交瘤的培养基中针对 PRO 的单克隆抗体的存在。优选地, 通过免疫沉淀法或通过体外结合检测法如放射免疫检测法 (RIA) 或酶联免疫吸附检测法 (ELISA) 检测由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。这些技术和检测法为本领域已知。单克隆抗体的结合亲和性可以例如通过 Munson 和 Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980) 描述的斯卡查德分析测定。

目标杂交瘤细胞鉴定后, 通过有限稀释方法将该克隆亚克隆并将其通过标准方法 (Goding, 同上) 生长。用于该目的合适培养基包括例如 Dulbecco's Modified Eagle's 培养基和 RPMI-1640 培养基。备选地, 将杂交瘤细胞在哺乳动物中在体内以腹水的形式生长。通过常规的免疫球蛋白纯化方法例如蛋白 A-琼脂糖凝胶、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱将由亚克隆分泌的单克隆抗体从培养基或腹水液体中分离或纯化。

也可通过重组 DNA 方法产生单克隆抗体, 例如用在美国专利 No. 4, 816, 567 中描述的那些方法。用传统的方法 (如通过用能特异性结合至编码鼠科抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 很容易地分离编码本发明的单克隆抗体的 DNA 并测序。本发明的杂交瘤细胞作为这种 DNA 的优选来源。一旦分离, 将 DNA 放入表达载体, 随后将所述载体转染进宿主细胞如猿 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤

细胞中来在重组宿主细胞中完成单克隆抗体的合成，其中所述的宿主细胞不能产生另外的免疫球蛋白。DNA 也受到修饰，如通过用人重链或轻链恒定结构域编码序列取代同源的鼠科序列（如美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison 等，同上），或通过将编码免疫球蛋白的序列共价地结合至非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分上。将这种非免疫球蛋白多肽取代本发明抗体的恒定结构域或取代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变结构域来产生嵌合二价抗体。

在另一个实施方案中，抗体是单价抗体。用于制备单价抗体的方法为本领域熟知。例如，一种方法涉及免疫球蛋白轻链和修饰过的重链的重组表达。一般在 Fc 区的任何位点将重链截短以便抑制重链交联。备选地，用其它的氨基酸残基取代相应的半胱氨酸或将其删除以便阻止交联。体外方法也适合制备单价抗体。消化抗体产生片段，特别是 Fab 片段，可使用本领域已知的常规技术来完成。

本领域已知的其它方法包括 Keamey 等，J. Immunol. 123: 1548-1558 (1979) 描述的方法，通过引用这些方法作为参考。简要地，用佐剂中的免疫原接种动物如小鼠或兔，并收集脾细胞及将其与骨髓瘤细胞系混合。通过加入聚乙二醇诱导细胞融合。通过将细胞涂布于含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶（HAT）的选择培养基中化学选择杂交瘤。接着根据产生抗肌醇六磷酸酶单克隆抗体的能力筛选杂交瘤。将产生抗体的杂交瘤克隆、扩展并冷冻储存以用于后面的生产。

在另外的实施方案中，将抗体直接用可检测的标记物标记以鉴定和定量饲料酶特别是肌醇六磷酸酶蛋白。用于免疫检测法的标记物通常为本领域技术人员所知并包括但不限于酶、放射性同位素和荧光物质、发光物质以及包括染色粒子如胶体金和乳胶小珠的生色物质。

备选地，通过与具有免疫球蛋白亲和性的被标记物质如蛋白 A 或 G 或二抗反应而间接标记抗体。将抗体与第二种物质结合并用具有对结合至抗体上的第二种物质有亲和性的受标记的第三种物质测定。例如，将抗体结合至生物素上并用受标记的抗生物素蛋白或链霉抗生物素（streptavidin）检测抗体-生物素缀合物。

在另外的实施方案中，将抗体结合至半抗原并用受标记的抗半抗原抗体检测抗体-半抗原缀合物。标记抗体和检测缀合物的这些及其它方法为本领域技术人员熟知。

可通过用饲料酶特别是上面描述的肌醇六磷酸酶免疫动物，根据本领域熟知的方法从生物液体中分离与蛋白反应的抗体，并将其收集和纯化，从而产生具有对饲料酶蛋白有相似或较高灵敏性的抗饲料酶特别是抗肌醇六磷酸酶的单克隆或多克隆抗体。

免疫检测法

将抗体和常规的免疫检测试剂一起装配在试剂盒内以使得用下面描述的免疫检测法用于检测理想的饲料酶或蛋白。试剂盒可任选地包含单克隆和多克隆抗体及用于检测样品中酶的存在标准品。含有这些试剂的试剂盒提供对蛋白简单、快速、现场检测。

将上面描述的抗体作为许多不同免疫检测法的基本试剂来检测样品中的饲料酶的存在。将抗体用于任何类型的免疫检测法，不管是定性或定量的免疫检测法。

在典型的定量夹心检测法中，有三个基本的部分。例如，在这种用于饲料酶如肌醇六磷酸酶的检测法中，用一抗将在基因改良的植物提取物或饲料提取物中如鸡饲料中的肌醇六磷酸酶蛋白捕获至固相中。在一个实施方案中，一抗是兔的抗饲料酶抗体。然后在一抗、饲料酶蛋白和已经加入孔中的二抗之间形成“三明治”。在一实施方案中，二抗是山羊的抗饲料酶抗体。在洗涤步骤将未结合的二抗除去后，用受标记的抗体检测结合的二抗。在特定的实施方案中，检测抗体是碱性磷酸酶标记的驴抗山羊抗体。加入检测酶即碱性磷酸酶的底物并通过读取每个孔的吸光率来测量颜色的产生。使用四参数曲线拟合来画出浓度对吸收率的标准曲线。

在本发明的一个实施方案中，用于检测饲料酶的免疫检测法包括以下步骤：

- a) 制备样品提取物；
- b) 将一部分提取物和与饲料酶结合的抗饲料酶一抗以及与和饲料酶

结合的抗饲料酶二抗孵育来产生抗体-聚合物-抗体复合物，其中所述的一抗结合至固体载体上，

- c) 洗涤抗体-聚合物-抗体复合物以除去未结合的二抗。
- d) 加入能与二抗发生免疫反应的检测抗体，其中检测抗体受到标记；并
- e) 测量结合的或未结合的受标记的抗体的量来检测流体中水处理聚合物的浓度。

在特定的实施方案中，饲料酶是肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和/或蛋白酶蛋白。在一更优选的实施方案中，肌醇六磷酸酶是热稳定性肌醇六磷酸酶。

在本发明的另一实施方案中，可检测标记物是酶。在更优选的实施方案中，酶是碱性磷酸酶、过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶。

在另一实施方案中，酶产生不可溶的反应产物。

本发明也提供用于通过免疫检测方法检测和定量的试剂盒，试剂盒包括：

- a) 用于从样品中提取饲料酶的手段；
- b) 含有结合至固体支持物上的抗饲料酶一抗的固体支持物；
- c) 抗饲料酶二抗；和
- d) 能免疫性结合至二抗的检测抗体，其中检测抗体用检测手段标记。

在一特定的实施方案中，检测手段是酶。在更优选的实施方案中，检测酶是碱性磷酸酶、过氧化物酶或 β -半乳糖苷酶。

在另一实施方案中，酶产生可溶或不可溶的反应产物。

在另一实施方案中，试剂盒进一步包含酶的底物。

这种免疫检测法也指酶联免疫吸附检测法（ELISA）。

上面描述的抗体也可在用于检测饲料酶如肌醇六磷酸酶的定性免疫检测法中采用。一种这类检测法通常指免疫检测试纸。用膜和过滤材料（filter）制成免疫检测试纸，并且借助它能通过毛细作用吸住液体样品。当样品沿着试纸条移动时，样品中的肌醇六磷酸酶与含在免疫检测试纸中的抗体发生反应。要检测鸡饲料中的肌醇六磷酸酶

蛋白，用缓冲液洗涤饲料，与固体物质分离并加至免疫检测试纸上。当液体样品流到免疫检测试纸的另一端时，肌醇六磷酸酶与特定的抗体反应并俘获于一条线上，这条线变得可见。检测测试线上的信号表明肌醇六磷酸酶存在于样品中。

在一个实施方案中，本发明提供了用于检测样品中饲料酶的免疫检测法，方法包括以下的步骤：

- a) 在存在能免疫识别提取物中的饲料酶的一抗下制备样品提取物，这样可形成一抗-饲料酶复合物；
- b) 制备具有显著三维尺寸的固相形式，以形成具有多个缝隙空间的显著体积，其上结合有能够免疫识别饲料酶的所需的二抗，其中所述二抗与检测手段缀合，并且其中所述二抗也免疫识别所述饲料酶。
- d) 将步骤(a)的提取物和步骤(b)制备的固相形式混合，由此提取物流过制备的固相形式的缝隙空间，捕获一抗-饲料酶复合物；
- e) 通过所述的捕获的一抗-饲料酶复合物的存在来检测饲料酶。

在其它实施方案中，饲料酶是肌醇六磷酸酶、木聚糖酶、纤维素酶、葡聚糖酶、淀粉酶、葡糖淀粉酶和/或蛋白酶蛋白。在一优选的实施方案中，肌醇六磷酸酶是热稳定性肌醇六磷酸酶。

在其它的实施方案中，固相形式是醋酸纤维素、纤维素、硝化纤维素或尼龙。在另一实施方案中，固相形式是由多个层叠和连续的层组成，其中每层能捕获不同的饲料酶。在一优选的实施方案中，固相支持物进一步包括固相形式的样品吸收层。在一更优选的实施方案中，免疫检测法进一步包含试纸，所述试纸包含标记的抗饲料酶抗体。

在一特定的实施方案中，检测手段是胶体金。

提供了采用上面描述的抗体的高度灵敏的免疫检测法。该检测法可用于检测基因改良的生物体，所述的生物体已经受到改造而包含编码饲料酶或蛋白的基因如肌醇六磷酸酶基因。该免疫检测法能检测样品中如动物饲料和基因改良农作物样品中低浓度的蛋白。

如上面描述，用于免疫检测法中的抗体能与由不同微生物表达的饲料酶特别是肌醇六磷酸酶蛋白上的表位或共同表位发生免疫反应，

并且与可能出现在样品中的其它蛋白最低程度地反应，因此可对样品中如谷类样品中基因改造过的有机体的存在提供精确的检测。

该检测法可用于检测不同样品包括动物饲料和农作物样品如植物材料中目标饲料酶蛋白如肌醇六磷酸酶的存在或量。样品可获自任何来源，其中目标蛋白可以接触到抗体。例如，样品可以是任何植物组织或提取物，包括根、茎、秸杆(stalk)、叶或种子或源于这些农作物的产品如食物级分。

上面描述的一种或多种抗体可用于任何非均质的或均质的、夹心的或竞争性的免疫检测法来检测饲料酶特别是例如肌醇六磷酸酶蛋白。将抗体用可检测的标记物标记或将抗体结合至固相上。用于将抗体结合至固相上的方法为本领域技术人员熟知。根据免疫检测方法，将含有饲料酶的样品与抗体在促进抗体结合至样品中的肌醇六磷酸酶的条件下反应足够长的时间。本领域技术人员应该了解免疫检测试剂与样品可以以不同的组合和顺序反应。采用物理手段将结合至固相上的试剂与未结合的试剂分离开，如微粒过滤、将反应溶液从包被的管和孔中倾出、磁分离、毛细作用及其它本领域技术人员已知的方法。也应该理解方法中可以包括独立地洗涤固相。

通过将样品产生的颜色强度与色卡比较或通过使用反射计来测定样品中饲料酶蛋白如肌醇六磷酸酶的浓度。

将得到的反应混合物或抗体和样品的组合物制备于溶液中，该溶液优化了抗体-饲料酶结合动力学。合适的溶液是含水溶液或缓冲液。溶液优选地的一些条件下提供，所述的条件将促进特异性结合，使非特异性结合最小化，溶解饲料酶，稳定和保持试剂反应性，并且溶液可包含缓冲液、去垢剂、溶剂、盐、螯合剂、蛋白、聚合物、碳水化合物、糖和本领域技术人员已知的其它物质。

将反应混合物反应足够长时间以使得抗体能反应并结合至饲料酶上形成抗体-饲料酶复合物。导致结合的最短反应时间是理想的，以使得完成检测需要的时间最少。用于免疫检测试纸测试的合适的反应时间少于或等于10分钟或在约一分钟到10分钟之间。优选少于5分

钟的反应时间。最优选地，反应时间少于三分钟。通过优化试剂，当混合试剂时结合基本完成。

可以在试剂不会分解或失活的任意温度下进行反应。在约 18° C 和 30° C 之间的温度是优选的，最优选的反应温度是环境温度或室温（约 22° C）。

固相形式如免疫测试试纸是理想地适合这种免疫检测法的。测试试纸条由多种有孔的组分、膜和过滤材料组成，所述的试纸条可通过毛细作用吸住液体样品。当样品中的饲料酶经过试纸条时与含于测试试纸条内的检测试剂发生反应。为了检测谷物或种子中的蛋白，将谷物碾碎成粉末并将蛋白用液体从粉末中提取出来，然后将该液体与固体材料分离并用检测法检测。将液体施用到免疫检测试纸条上，饲料酶朝试纸条的远末端移动。当它沿着试纸条移动时，饲料酶与施加于或固定于试纸条上的试剂发生反应而引起可检测的信号产物。信号的检测表明在样品中存在饲料酶。

在一实施方案中，固相形式是醋酸纤维素、纤维素、硝化纤维素或尼龙。在一优选的实施方案中，固相形式是硝化纤维素。

在另一实施方案中，固相形式包含样品吸收层、硝化纤维素条和含有标记的抗-饲料酶抗体的底层。

然而在另一实施方案中，固相形式是由多个堆叠和连续的层组成，其中每层能捕获不同的饲料酶。

免疫检测试剂盒

用于检测样品中的饲料酶的免疫检测试剂盒含有一种或多种上面描述的抗体。试剂盒可以额外地包含获得样品的装置、容纳试剂的容器、定时装置、用于稀释样品的缓冲液和比色计、反射计或标准物，其中对照标准物可测量颜色的变化。试剂盒可包含如上描述的免疫检测试纸形式的试剂。

在一优选的实施方案中，包括抗体的试剂是干燥的。将含水的样品加至小瓶或试纸条导致干的试剂溶解，使得试剂发生反应。

通过参考下面的非限制性实施例，将会进一步了解上面描述的试

剂、免疫检测方法和试剂盒。下面的实施例显示了可用于检测样品如饲料或其它植物材料中的饲料酶特别是肌醇六磷酸酶的典型的试验方法和试剂。以举例说明的方式而不是以限定的方式提供这种实施例。

上面引用的参考在这里全文引用作为参考。

实施例

这些方法和材料描述了用于制备玉米样品和生产用于下面描述的实施例中的单克隆抗体的一般方法。

材料和方法

玉米样品：玉米提取物源于Hi II 种子或A188种子（非转基因）或基因改造的肌醇六磷酸酶种子。使用Kleco组织研磨器将五颗玉米粒研磨成粉。将得到的玉米粉末悬浮于5 ml蒸馏水中溶解蛋白。在ELISA中或用免疫检测试纸条检测上清液。

多克隆抗体的产生

对于免疫：在初次的注射后，28天后将动物（兔或山羊）加强免疫。在这之后的每次强化是每21天进行。在每次强化后10天将动物放血。

对于鸡，第一次强化免疫是初次注射后7天，随后每28天强化一次。每次强化后10天将鸡放血，如果检测到好的抗体滴定度，收集强化接种后产的蛋。

免疫剂是从大肠杆菌表达体系纯化来的完整的肌醇六磷酸酶蛋白。对于第一次注射入动物中，将蛋白在弗氏完全佐剂中乳化。增强免疫剂是在弗氏不完全佐剂中。用于产生多克隆抗体的动物是兔、鸡和山羊。

肌醇六磷酸酶（Nov9X）纯化：

与10%山梨醇、10% NaCl和 pH 4.2一起配制的肌醇六磷酸酶（Nov9X）用SnakeSkin 10K MWCO 透析管（Pierce, Rockford, IL）用25 mM Tris-HCl, pH 8.0 于 4℃透析过夜。透析后将固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加至肌醇六磷酸酶混合物中，最初达到 0° C下的25%的饱和度，然后达到50%的饱和度并最后达到75%的饱和度。当加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至25%的饱

和度时将混合物在0° C下搅拌30分钟，然后以20,000转 / 分离心20分钟。对于倾出的上清液，加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至50%的饱和度而将沉淀物再悬浮于25 mM Tris-HCl, pH 9.0中。将该步骤进行3次以产生0-25%、25-50%和50-75%饱和度的Nov9X $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀颗粒。SDS-PAGE分析表明在50-75%的级分中存在Nov9X。将该级分用25 mM Tris-HCl, pH 9.0透析并制备用于柱层析纯化。

用5.0 mL/min的流速将来自50-75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 级分的粗Nov9X TAM上样至HiTrapQ阴离子交换柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)。将在30分钟产生的25 mM Tris-HCl, pH 9.0中0-0.4 M NaCl的线性梯度用来洗脱Nov9X。在280 nm进行吸光率测量以监控层析。SDS-PAGE分析后汇集最纯的含有Nov9X的级分，用Centricon Plus-20离心浓缩机 (Millipore, Bedford, MA) 浓缩，并以1 mL/min 的流速将其上样至26/60 Sephacryl S100型大小排阻层析柱上。洗脱缓冲液是25 mM Tris-HCl, pH 9.0。收集含有纯Nov9X 的级分，将其浓缩，用25 mM Tris-HCl, pH 8.0透析并用于下面的分析。

实施例1: 肌醇六磷酸酶ELISA

该实施例描述了用 ELISA 免疫学技术检测和定量测量玉米样品中的肌醇六磷酸酶。

步骤

将多孔板 (Nunc, Maxisorp) 使用用硼酸盐缓冲液 pH 8.5 (50 mM 硼酸钠/硼酸, 75 mM NaCl) 稀释的 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的兔抗肌醇六磷酸酶抗体于4°C 包被过夜，用 Tris 碱缓冲液 pH 8.0 (10 mM 含有 0.05% Tween-20 和 0.03% 叠氮化钠的 Tris) (洗涤缓冲液) 洗涤板五次。注意：在每次孵育期后进行同样的洗涤步骤来除去未结合的抗体/样品。然后用 PBS/tween-20/BSA 缓冲液 pH 7.4 (1%的牛血清白蛋白、0.05%的 Tween-20、0.03%的叠氮化钠、150 mM NaCl, 于 100 mM 磷酸钠, pH 7.4 中 (稀释液)) 室温下将板封闭 45 分钟。将 50 微升的每个样品加至板中并室温下孵育 1.5 小时。然后将山羊抗-肌醇六磷酸酶抗体 (在稀释液中稀释至 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 加至板中并于 37°C 孵育 1 小时。

将检测抗体（碱性磷酸酶标记的驴抗-山羊抗体，其在稀释液中稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ ）加至板中于 37°C 下孵育 1 小时。加入底物即对硝基苯磷酸盐（pNPP）并让其在室温下反应 30 分钟。用 492 nm 作为参考，于 405 nm 下测量吸光率。

检测法特性

肌醇六磷酸酶标准曲线是 4-参数曲线拟合曲线（见图 1）。对于 0.04-16 ng/ml 的范围画出其相对的 log 值的线性曲线。为了画出 logX 轴上的 4-参数标准曲线，0 ng/ml 的标准必须以 0.01 ng/ml 输入分析程序而不是 0 ng/ml。虽然任何四参数曲线拟合程序都可以，使用的分析程序是 Tecan Sunrise™ 微量滴定板读数器的 WinSelect™ 软件。

最小可测定剂量（MDD）是在统计上可与零标准区别的肌醇六磷酸酶蛋白的最低水平。最低可检测剂量通过 24 次重复分析阴性对照的 1 mg/ml 全部蛋白的玉米种子提取物而得以测定。给平均值加上零标准平均值 O.D. 的两个标准偏差（95% 置信界限），使用标准曲线确定该总 O.D. 值的剂量。最小可测定剂量是 0.044 ng/ml。

通过在 21 个不同的检测试验中检测 4 个不同的对照样品测定批间精密度。样品是掺入 ELISA 稀释液中的纯化的肌醇六磷酸酶。结果在下面表 1 中给出。对于在标准曲线的线性部分测量的样品浓度，精密度好，少于 15%。

表 1. 批间（Between-run）精密度测试。

样品	平均的肌醇六磷酸酶 ng/ml	标准偏差	%变异系数
1	9.65	2.27	23.5%
2	2.99	0.38	12.8%
3	0.94	0.11	12.0%
4	0.39	0.10	25.6%

通过重复检测 20-24 次下面的样品测定批内精密度。样品是掺入 ELISA 稀释液中的肌醇六磷酸酶。结果在下面的表 2 中列出。全部样

品得到很好的精密度，表明进行的单个检测内有很好的可重复性。

表 2. 批内 (within-run) 精密度测试。

样品	平均的肌醇六磷酸酶 ng/ml	标准偏差	%变异系数
1	0.463	0.030	6.44%
2	2.293	0.264	11.51%
3	5.224	0.787	15.07%

用ELISA稀释液稀释4份玉米种子提取物以测试检测的线性。玉米提取物源于Hi II 种子或A188种子（非转基因）或基因改造的肌醇六磷酸酶种子。使用Kleco组织研磨器将五颗玉米粒研磨成粉。将得到的玉米粉末悬浮于5 ml 蒸馏水中以溶解蛋白。在ELISA中或用检测试纸条检测上清液。从稀释的样品中回收肌醇六磷酸酶的百分比是可以接受的。

表 3 检测测试的线性

样品	稀释比	测量的肌醇六磷酸酶 (ng/ml)	测量的值 X 稀释比	回收百分比
A	1/2500	12.76	31900	82%
	1/5000	5.85	29250	75%
	1/10,000	3.90	39000	100%
B	1/2500	6.87	17175	52%
	1/5000	6.90	34500	104%
	1/10,000	3.33	33300	100%
C	1/2500	3.58	8950	63%
	1/5000	2.35	11750	83%
	1/10,000	1.41	14100	100%
D	1/2500	6.11	15275	72%
	1/5000	3.54	17700	83%
	1/10,000	2.13	21300	100%

实施例 2: 肌醇六磷酸酶免疫检测试纸条

该实施例描述使用免疫检测试纸条检测法来检测样品中肌醇六磷酸酶的存在。

方法

通过将饲料加至 50 ml 的离心分离机直到 15 ml 刻度而制备浆状鸡饲料的提取物。将这些量的饲料加至提取袋内的网格的一边。加入提取缓冲液（25 ml 含有 0.5% Tween-20 的 0.1 M 硼酸盐 pH 7.5）并且将缓冲液轻轻压过饲料来确保所有的饲料都是湿的。在施加 3-5 滴提取物至免疫检测试纸条用于检测之前，将提取物室温下孵育至少 10 分钟。

免疫检测试纸条

简要地，侧流免疫检测试纸条包含由一塑料衬层 (Arista™ 牌塑料盒, Bethlehem, PA) 支持的确化纤维素检测膜 (2.5 x 18 cm)，其中喷涂了 1 mm 线的特异性兔（也可以使用鸡抗体）抗肌醇六磷酸酶多克隆抗体。在第一条抗体线上也平行的喷涂了驴抗-山羊抗体的试剂对照线。确化纤维素试纸条的底端部分用一片处理过的聚酯试纸条再盖一层。先用溶液 B（0.5% BSA、0.5% 聚乙烯醇和 0.1% Triton X-100；50 mM 磷酸缓冲液 pH 7.4）和结合在山羊抗-肌醇六磷酸酶抗体的胶体金处理聚酯试纸条。让聚酯试纸条变干。然后用棉质样品施加层在聚酯试纸条上再附一层。也将样品施用层用溶液 C（0.1% Triton X-100 和 0.1 M 硼酸缓冲液 pH 8.5）进行预处理并让其干燥。在确化纤维素试纸条另一端或顶端侧面的是另一棉质层，其用以在样品流过确化纤维素上的检测抗体区和对照抗体区时吸收样品溶液。然后将完成的纸片切成 4 mm 的检测试纸条使其适合装入塑料盒中，塑料盒具有一个位于样品层上面的椭圆形样品施加孔并且位于确化纤维素膜检测区上有一矩形窗口。

通过加入 150 μ l（3-5 滴）提取物至样品孔中进行检测。等待约 5-10 分钟后，结果出现在结果窗口。如果样品中存在肌醇六磷酸酶，结果窗口中会出现两条红线。较低的线表示肌醇六磷酸酶的存在而上面的线是对照线，其表示设备正常运行。如果不存在肌醇六磷酸酶，就仅有一条单一的红色对照线出现在结果窗口。见显示样品免疫检测试纸条的图 3 和图 4。图 3 显示检测肌醇六磷酸酶的存在。如箭头表示，20 分钟后检测到的肌醇六磷酸酶开始下降，因为这时肌醇六磷酸

酶开始丧失活性。

免疫检测试纸条的详细制备步骤。

肌醇六磷酸酶第二代检测试纸条-膜的包被

材料

1. 纸片, 2.25 英寸 x 180 mm, 有 AE100 膜
2. PBS 中 1.0 mg/ml 的鸡抗肌醇六磷酸酶 IAP
3. PBS 中 0.15 mg/ml 的 Jackson 驴抗-山羊抗体
4. Pierce RBS 去垢剂

步骤

包被检测线:

1. 通过按 vol, 18, 回车、回车, 将 Camag™ 喷雾器体积设定为 18 (1 μ l/cm)。
2. 通过按 track, 1, 回车、回车, 将通道设定为 1。
3. 将卡片置于平台上。将卡片有 2 张纸片的部分放置在最靠近仪器的前面的位置。用磁铁稳定卡片。
4. 将注射器装满 1.0 mg/ml 的鸡抗-肌醇六磷酸酶 IAP。
5. 在 30 mm 处设定喷物头。
6. 打开气体供应并通过按 gas、calc、run 键开始进行喷雾。很近的观察喷雾模式以保证喷雾的连贯性和精确性。
7. 对每张其它的卡重复进行 3-6 步骤。
8. 移开注射器并用 Pierce RBS 去垢剂 (20 μ l 浓缩液/ml dH₂O) 洗涤 5 次, 然后用 dH₂O 洗涤 10 次。

包被对照线:

9. 通过按 vol, 18, 回车、回车, 将 Camag 体积设定为 18 (1 μ l/cm)。
10. 通过按 track、1, 回车, 回车, 将通道设定为 1。
11. 将注射器装满 0.15 mg/ml 的驴抗-抗山羊抗体。
12. 在 36 mm 处设定喷雾头。
13. 打开气体供应并通过按 gas、calc、run 键开始进行喷雾。很近的观察喷雾模式来保证喷雾的连贯性和精确性。

14. 对每张其它的卡重复进行 11-13 步骤。
15. 移开注射器并用 Pierce RBS 去垢剂 (20 μ l 浓缩液/ml dH₂O) 洗涤 5 次, 然后用 dH₂O 洗涤 10 次。
16. 于 33°C 将卡干燥过夜, 然后转为室温。
17. 室温下干燥储存。

肌醇六磷酸酶检测试纸条-包被缀合物至聚酯上

材料

1. 金缀合的山羊抗-NOV9X, OD = 50
2. 聚酯片, 2033 级, 用溶液 B 处理
3. 蔗糖
4. 海藻糖
5. Pierce RBS 去垢剂

步骤

18. 用金稀释液稀释金缀合物至 OD = 50
19. 将 20% 蔗糖和 5% 海藻糖加至金缀合物来使其稳定 (每 1 ml 金缀合物加入 0.2 g 蔗糖和 50 mg 海藻糖)。混合直至完全溶解。
20. 通过按 vol, 27, 回车、回车, 将 Camag™ 体积设定为 27 (1.5 μ l/cm)。
21. 通过按 track, 1, 回车、回车, 设定通道。
22. 将聚酯片置于平台上并用磁铁稳定。
23. 将注射器装满稳定的金缀合的山羊抗-NOV9X (OD = 50)。
24. 在 15 mm 处设定喷雾头。
25. 打开气体供应并通过按 gas、calc、run 键开始进行喷雾。很近的观察喷雾模式来保证喷雾的一致性和精确性。
26. 将喷雾头移动 9mm (设定值为 24mm)。
27. 打开气体供应并通过按 gas、calc、run 键开始进行喷雾。
28. 继续喷涂缀合物, 每次喷涂移动 9mm, 直到整个聚酯片充满。一片聚酯片将有八条线。
29. 在 37°C 下干燥 1 小时。
30. 切成 1/4" 的试纸条, 这样使得金缀合物线处于每条试纸的顶端。

31. 室温下干燥储存

清洁仪器

移开注射器并用 Pierce RBS 去垢剂 (20 μ l 浓缩液/ml dH₂O) 洗涤 5 次, 然后用 dH₂O 洗涤 10 次。

用 dH₂O 清洗仪器平台。

肌醇六磷酸酶试纸条-组装

材料

6. 用 1.0 mg/ml 和 1 μ l/cm 的鸡抗肌醇六磷酸酶 IAP 包被的卡片。
7. 5/8" x 180 mm 大小的#40 吸水纸的试纸条(顶层)
8. 用溶液 C, pH 8.6 处理的 3/4" x 180 mm 大小的#903 吸水纸的试纸条(底层)。
9. 喷涂金缀合物 (1.5 μ l/cm 的山羊抗-NOV9X, OD = 50) 的 1/4"x 180 mm 试纸条。
10. 手套

步骤

注意: 在低于 40%湿度的条件下装配试纸条。戴上手套操作所有组分。

1. 在卡片底端将两个衬层 (liners) 从胶带上移除。
2. 将带有金缀合物的金试纸条放置在顶端并与膜重叠 1-1.5 mm。
3. 将底端层沿卡片的底端边缘放置, 注意让金试纸条暴露在外。
4. 从沿着卡片顶部的胶条上除去衬垫。将顶层沿着卡片的顶端放置并与膜重叠 1-1.5mm。
5. 室温下储存完成的卡片干燥直到可用于切割成条。
6. 将试纸条切割成 4 mm 长。一张卡片将产生大约 40 个试纸条。室温下干燥储存试纸条。

实施例 3: 检测酶活性肌醇六磷酸酶。

步骤

通过加热至 99°C 达 60 分钟将毕赤氏酵母 (*Pichia*) 产生的纯化的肌醇六磷酸酶失活。然后测试该肌醇六磷酸酶的酶活性并与在肌醇

六磷酸酶 ELISA 的反应性（图 2）以及与肌醇六磷酸酶免疫检测试纸条（图 3）的反应性比较。

ELISA 比较：图 2 显示于 99° C 04-28-03 下孵育后 Nov9X 的剩余活性的图（FPLC 纯化的 TAM Lot#PHY-PP9XR-PB200L，活性与 ELISA 数据的比较），这表明 ELISA 检测和免疫检测试纸条似乎仅检测有活性的肌醇六磷酸酶。通过加热而失活的肌醇六磷酸酶在两个检测中都没有检测到。

实施例 4：肌醇六磷酸酶免疫检测试剂盒

这种诊断测试（见图 4）设计用于快速（10 分钟）检测饲料中的肌醇六磷酸酶。该试剂盒含有完成该测试需要的全部试剂和装置。该试剂盒可在不超过 100°F（38°C）的环境温度下储存。将该测试材料包装于密封防潮箔袋中，箔袋中装有能吸潮的硅胶干燥剂。让测试材料保存在它的包装中直到使用之前。避免将测试材料放置在潮湿的地方。

检测步骤

1. 将大试管装上饲料直到 15 的刻度。将这些量的饲料加至提取袋内的网格层的一边。
2. 从试剂盒取出一个提取缓冲液的塑料容器（25ml）并将其注入提取袋中。
3. 关上口袋并轻轻的移动缓冲液让其处于饲料上而确保所有的饲料都是湿的。等待至少 10 分钟。
4. 从箔袋中取出现场测试材料（Field Test）并置于平的干燥表面上。检查干燥剂。干燥剂应该是蓝色的。如果是粉红色的，检测材料就不再有效并应该丢弃。
5. 使用移液管，移取 3-5 滴饲料提取液充满现场检测材料的样品孔内。
6. 等待约 5 分钟让结果出现于样品孔上的窗口中。

结果

如果样品中存在肌醇六磷酸酶，现场检测材料的结果窗口中会出

现两条红线。较低的线表示肌醇六磷酸酶的存在而上面的线是对照线，其表示设备正常运行。检测线将不会和对照线一样强。检测线上所见的任何反应都认为是阳性的。

如果不存在肌醇六磷酸酶，就仅有一条单一的红色对照线出现在结果窗口。

实施例 5. 丸状饲料中的肌醇六磷酸酶的检测

该实施例阐述了使用免疫检测试纸条检测法来检测丸状动物饲料中的肌醇六磷酸酶。

方法和试剂是如上面实施例4中描述的，不同的是可用任何机械装置将丸状动物饲料碾碎为颗粒状或粉末状的稠度，并且提取缓冲液是含有水溶液中0.5% Tween-20的5%甲醇而不是硼酸盐缓冲液。而且，抗-肌醇六磷酸酶抗体是来自鸡而不是兔。结果在下面的表4中列出。表4表明使用ELISA和免疫检测试纸条检测法在浆状（在成丸状之前）饲料和丸状饲料中都检测到了Quantum[®]肌醇六磷酸酶。表5 显示用免疫检测试纸条和ELISA，在起始饲料（在成丸状前）和粉碎的饲料（成丸后的饲料）中Quantum肌醇六磷酸酶是可检测的。活性也用酶活性检测法进行确认。

表 4 丸状饲料中的肌醇六磷酸酶的检测

食物	平均 ng/ml	加入的肌醇六磷酸酶水平	类型
RA0309 起始料 1	0	0	浆状
RA0309 起始料 9	0	0	颗粒
RA0309 起始料 4	0	0	浆状
RA0309 起始料 15	0	0	颗粒
RA0309 起始料 11	22.3375	285	浆状
RA0309 起始料 19	24.9875	285	浆状
RA0309 起始料 2	8.8425	285	颗粒
RA0309 起始料 23	10.93	285	颗粒
RA0309 起始料 6	27.495	566	浆状
RA0309 起始料 17	46.25	566	浆状
RA0309 起始料 13	19.76	566	颗粒
RA0309 起始料 21	24.425	566	颗粒
RA0309 起始料 3	58.19	1133	浆状
RA0309 起始料 14	69.0275	1133	浆状
RA0309 起始料 7	20.7225	1133	颗粒
RA0309 起始料 22	32.825	1133	颗粒
RA0309 起始料 12	153.62	2832	浆状
RA0309 起始料 24	173.7425	2832	浆状
RA0309 起始料 10	104.2125	2832	颗粒
RA0309 起始料 28	100.6525	2832	颗粒
RA0309 起始料 5	0	305	Ronozyme
RA0309 起始料 26	0	605	Ronozyme

表 5 肌醇六磷酸酶活性和 ELISA 定量起始饲料和粉碎饲料中肌醇六磷酸酶。

起始料	可提取活性平均值 (FTU/kg)	ELISA 结果 ng/ml
T1	37.7	0.0
T2	301.1	4.9
T3	426.3	16.7
T4	74.8	0.0
T5	209.8	7.5
T6	449.3	17.3
T7	58.0	0.0
T8	152.7	4.0
T9	806.6	13.3
T10	436.5	18.4
粉碎饲料		
T1	50.6	0.0
T2	142.2	4.5
T3	353.7	11.4
T4	68.7	0.0
T5	167.7	12.7
T6	237.8	9.1
T7	50.4	0.9
T8	234.4	8.8
T9	301.7	13.6
T10	711.0	22.5

从前面详细的描述，对当前的用于检测饲料酶蛋白，特别是肌醇六磷酸酶的试剂、方法和试剂盒的调整对本领域技术人员是显而易见的。

尽管通过参考其特定的实施方案本发明得以描述，应该理解，许多变动、调整以及另外的实施方案是可能的，并因此，所有的这种变动、调整和实施方案也应认为是在本发明的范围内。

在许多专利、申请和参考文献在本说明书中讨论或引用，并通过全文引用作为参考。

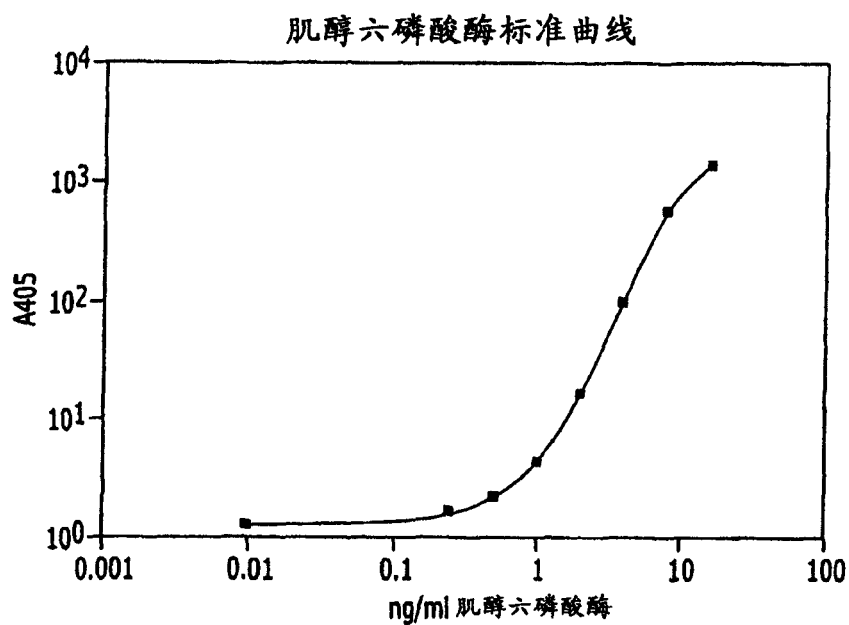


图 1

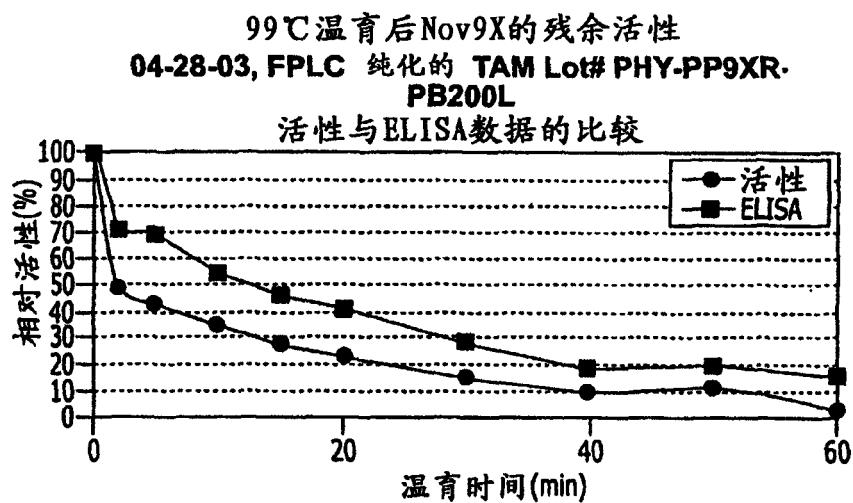


图 2

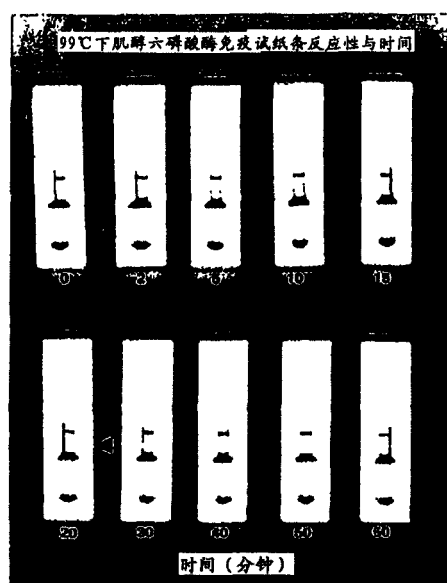


图 3

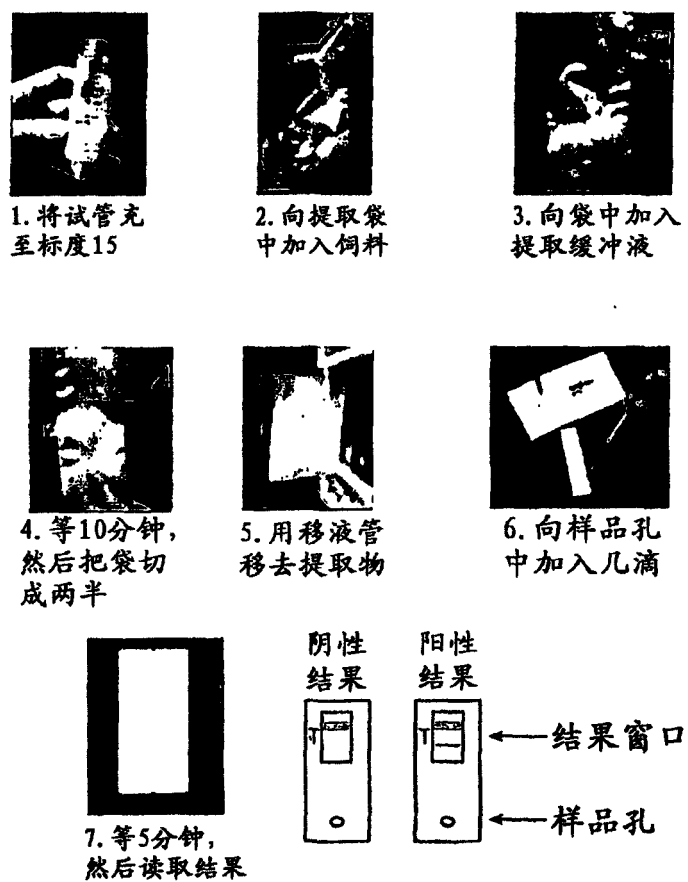


图 4

专利名称(译)	用于检测饲料酶的试剂、方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1833168A	公开(公告)日	2006-09-13
申请号	CN200480022707.7	申请日	2004-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	先正达参股股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	辛根塔参与股份公司		
当前申请(专利权)人(译)	辛根塔参与股份公司		
[标]发明人	MS亚内尔 L·蔡托尼		
发明人	M·S·亚内尔 L·蔡托尼		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/573		
代理人(译)	程泳		
优先权	60/485602 2003-07-07 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫学领域并更特定地涉及用于检测蛋白和酶，特别是饲料酶的免疫检测方法、试剂盒和试剂。

