

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610089306.4

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月29日

[11] 公开号 CN 1869073A

[22] 申请日 2006.6.16

[21] 申请号 200610089306.4

[71] 申请人 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 刘威 邓艾兴 李召虎
赵静 何素平 南铁贵 俞彩霞
何钟佩

[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5页

[54] 发明名称

一种 EPSPS 酶的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 EPSPS 酶的抗体及其制备方法与专用抗原及应用，其目的是提供一种抗除草剂草甘膦的 EPSPS 酶的抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备转 EPSPS 免疫检测试剂盒中的应用。用于制备 EPSPS 酶抗体的抗原，是将具有序列表中 SEQ ID No: 1 的多肽与载体蛋白联结得到。EPSPS 酶的抗体，是用所述抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到的抗体。该抗体具有下述优点：1) 具有较高的特异性，可用于转 EPSPS 植物中 EPSPS 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 EPSPS 植物的生物检测领域发挥重要作用，市场前景广阔。

- 1、用于制备 EPSPS 酶抗体的抗原，是将具有序列表中 SEQ ID No: 1 的多肽与载体蛋白联结得到。
- 2、根据权利要求 1 所述的抗原，其特征在于：所述多肽的合成方法为固相合成法；所述固相合成法为叔丁氧羰基化学法或 9-氟甲氧羰基化学法。
- 3、根据权利要求 1 或 2 所述的抗原，其特征在于：所述载体蛋白联结于所述多肽的氨基端或羧基端。
- 4、根据权利要求 1 或 2 所述的抗原，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。
- 5、根据权利要求 1 或 2 所述的抗原，其特征在于：所述将多肽与载体蛋白进行联结的方法为戊二醛法。
- 6、EPSPS 酶的抗体，是用权利要求 1 所述的抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到的抗体。
- 7、根据权利要求 6 所述的 EPSPS 酶抗体，其特征在于：所述用于制备 EPSPS 酶抗体的免疫动物为鸡、兔、鼠、羊或马。
- 8、一种制备权利要求 6 所述的 EPSPS 酶抗体的方法，包括以下步骤：
 - 1) 用权利要求 1 所述的抗原免疫动物；
 - 2) 从步骤 1) 经免疫的动物中分离、纯化血清，得到 EPSPS 酶抗体。
- 9、根据权利要求 8 所述的制备方法，其特征在于：所述步骤 1) 中用于制备 EPSPS 酶抗体的免疫动物为鸡、兔、鼠、羊或马。
- 10、转 EPSPS 免疫检测试剂盒，其活性成分为要求 6 所述的 EPSPS 酶抗体。

一种 EPSPS 酶的抗体及其制备方法与专用抗原及应用

技术领域

本发明涉及抗除草剂草甘膦的 EPSPS 酶的抗体及其制备方法与专用抗原及应用，特别是涉及一种抗除草剂草甘膦的 EPSPS 酶的抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备转 EPSPS 免疫检测试剂盒中的应用。

背景技术

研究表明，将抗除草剂草甘膦 EPSPS（5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶）基因转化植物（如大豆、棉花、玉米、油菜等），转基因植株可获得除草剂草甘膦抗性。这是由于转基因植物体内的 EPSPS 过量表达，对除草剂草甘膦不敏感。目前，转 EPSPS 免疫检测试剂盒已广泛应用于大规模对转抗除草剂草甘膦 EPSPS 基因植物的真伪鉴定，食品中转 EPSPS 基因的成分分析及生物安全性的研究。转 EPSPS 植物的检测方法主要有三种：（1）生物试法；（2）DNA 检测法；（3）蛋白的免疫检测法。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 检测法只是检测基因，并不代表蛋白水平，且对于抗性的高低并无指导意义；与前两种方法相比，免疫检测法方便、实用、快速、经济。

转 EPSPS 免疫检测试剂盒的好坏完全取决于抗除草剂草甘膦大豆 EPSPS 抗体的好坏。据国内外文献报道，抗草甘膦 EPSPS 抗体是以大肠杆菌发酵、提取、纯化的蛋白作为抗原免疫动物得到的。但由于蛋白的分离和纯化非常困难，在纯化过程中不可避免地会掺入一些杂蛋白，即使是非常纯的蛋白，由于多个抗原决定簇的存在，所制备的抗除草剂草甘膦 EPSPS 抗体往往也会产生交叉反应，影响抗体的特异性。为解决抗体的特异性问题，目前，国外转 EPSPS 免疫检测试剂盒中的 EPSPS 抗体多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 EPSPS 酶抗体的专用抗原。

本发明所提供的制备 EPSPS 酶抗体的专用抗原，是将具有序列表中 SEQ ID No: 1 的多肽与载体蛋白联结得到。

序列表中的 SEQ ID No: 1 由 13 个氨基酸残基组成。肽的合成通常用固相合成法，如叔丁氧（酰）羰基（t-BOC）化学法或 9-氟甲氧羰基（FMOC）化学法。

所述载体蛋白既可以联结于所述多肽的氨基端（N 端），也可以联结于其羧基端

(C端)。

所述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。

可采用常规的戊二醛法将多肽与载体蛋白进行联结。

本发明的第二个目的是提供一种 EPSPS 酶的抗体。

本发明所提供的 EPSPS 酶的抗体，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 EPSPS 酶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 EPSPS 酶抗体的制备方法。

本发明所提供的 EPSPS 酶抗体的制备方法，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 EPSPS 酶的抗体。

在上述制备方法中，步骤 3) 中用于制备 EPSPS 酶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转 EPSPS 免疫检测试剂盒。

本发明所提供的转 EPSPS 免疫检测试剂盒，其活性成分为上述 EPSPS 酶的抗体。

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、抗草甘膦 EPSPS 蛋白标样和 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 EPSPS 酶的抗体。该抗体具有下述优点：1) 具有较高的特异性，可用于对转 EPSPS 植物(如大豆、玉米、大豆、烟草等)中 EPSPS 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 EPSPS 植物的生物检测领域发挥重要作用，市场前景广阔。

下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

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、抗草甘膦 EPSPS 抗体的制备

一、EPSPS 多肽片断的选择和合成

对 GenBank 数据库中 aroA 基因 (GenBank 号为: Q9R4E4) 所编码的农杆菌 CP4 菌株的 EPSPS 的氨基酸序列进行理化分析，从中选择一段特定的由 13 个氨基酸残基组成的多肽 (序列表中的 SEQ ID No: 1)，分子量为 1326.66，用常规的固相合成法

合成该多肽。

二、免疫抗原的制备

将步骤一合成的多肽与牛血清白蛋白（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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g 加水至 1000mL, pH 7.2) 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 EPSPS 抗体

采用体重 20 克左右的 7 周龄雌性 Balb/c 小鼠作为免疫动物。以步骤二制备的多肽-BSA 的联结物作为抗原，免疫动物，制备 EPSPS 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 $1.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ （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 0.2mL/小鼠。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 EPSPS 含量的检测。

实施例 2、EPSPS 的免疫检测

用 ELISA 方法对抗草甘膦的 EPSPS 转基因大豆进行检测，所用的常规大豆品种包括科丰 14 和中黄 13（由中国农业大学农学与生物技术学院化控中心提供），抗草甘膦转 EPSPS 转基因大豆品种 D011 可参照文献（阚贵珍，喻德跃. 试纸条法和 PCR 法检测抗草甘膦转基因大豆的外源基因. 中国油料作物学报[J]. 2005, 27(4): 18—21）中的方法获得，具体检测过程包括以下步骤：

（1）称取转基因大豆样品 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 $100\mu\text{L}$ ，于 37°C 温箱中温育 3h，然后弃去孔内液体，用洗涤液洗板四次，甩干；

(3) 将实施例 1 制备的 EPSPS 抗体用样品稀释液 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.96g, KH_2PO_4 0.2g, NaCl 8.0g, 明胶 1.0g, 1mL 吐温-20, 加水至 1000mL, pH 7.0) 按 1: 500 的比例进行稀释, 向酶标板每孔中加入 $100 \mu\text{l}$, 置于 37°C 温箱中温育 30min, 然后弃去孔内液体, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

(4) 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, 向酶标板每孔中加入 $100 \mu\text{l}$, 置于 37°C 温箱中温育 30min, 然后弃去孔内液体, 用洗涤液洗板 4 次, 甩干;

(5) 向酶标板每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 底物 (邻苯二胺 10-20mg, 2-4ul H_2O_2 , 溶于 20mL 底物缓冲液 (柠檬酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.55g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.215g, 加水至 500mL, pH 5.0) 中), 在常温下进行显色反应, 并用 2N 硫酸终止反应, 在酶标仪上测定各孔 492nm 处的 OD 值。

显色结果表明, EPSPS 转基因大豆明显比常规大豆显色深, OD_{492} 值见表 1, 证明用本发明的 EPSPS 抗体及 ELISA 方法能够有效地区别 EPSPS 转基因大豆和常规大豆。

表 1 常规大豆和抗草甘膦大豆中的 EPSPS 对比

品种	常规大豆品种		转基因大豆品种
(optical density)	科丰 14	中黄 13	0.33
OD_{492} 值	0	0	

序列表

<160> 1

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

Met Ser His Gly Ala Ser Ser Arg Pro Ala Thr Ala Arg

1

5

10

专利名称(译)	一种EPSPS酶的抗体及其制备方法与专用抗原及应用		
公开(公告)号	CN1869073A	公开(公告)日	2006-11-29
申请号	CN200610089306.4	申请日	2006-06-16
[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 刘威 邓艾兴 李召虎 赵静 何素平 南铁贵 俞彩霞 何钟佩		
发明人	王保民 刘威 邓艾兴 李召虎 赵静 何素平 南铁贵 俞彩霞 何钟佩		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/195 C07K16/40 G01N33/53		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN100393749C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种EPSPS酶的抗体及其制备方法与专用抗原及应用，其目的是提供一种抗除草剂草甘膦的EPSPS酶的抗体及其制备方法与专用抗原及其在制备转EPSPS免疫检测试剂盒中的应用。用于制备EPSPS酶抗体的抗原，是将具有序列表中SEQ ID No：1的多肽与载体蛋白联结得到。EPSPS酶的抗体，是用所述抗原免疫动物，再从所免疫的动物中分离、纯化血清得到的抗体。该抗体具有下述优点：1)具有较高的特异性，可用于转EPSPS植物中EPSPS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EPSPS植物的生物检测领域发挥重要作用，市场前景广阔。

表1 常规大豆和抗草甘膦大豆中的 EPSPS 对比

品种	常规大豆品种		转基因大豆品种
(optical density)	科丰 14	中黄 13	0.33
OD ₄₉₂ 值	0	0	