



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104865376 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510246529. 6

(22) 申请日 2015. 05. 14

(71) 申请人 北京化工大学

地址 100029 北京市朝阳区北三环东路 15
号

申请人 德州玲珑轮胎有限公司

(72) 发明人 王赛 王锋 董益阳 张继川
张立群 赵永升 邢涛 祝静
孙艳波 聂秋海

(74) 专利代理机构 北京君恒知识产权代理事务
所（普通合伙） 11466

代理人 张璐 林潮

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

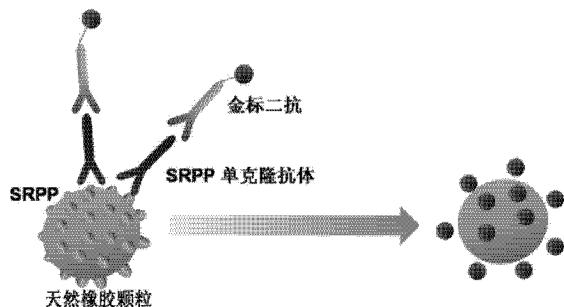
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种天然橡胶颗粒观测方法及其在橡胶植物
品系筛查中的应用

(57) 摘要

本发明涉及一种橡胶颗粒观测方法及该方法
在高产胶量橡胶植物尤其是高产胶量橡胶草的品
系筛查中的应用。本发明方法的特征在于，所述方
法利用标记免疫学识别技术进行观测。本发明方
法可以对天然橡胶颗粒进行定性和定量观测，由
此可以快速有效地对高产胶量橡胶植物尤其是高
产胶量橡胶草品系进行筛查。



1. 一种观测橡胶颗粒的方法,其特征在于,所述方法利用标记免疫学识别技术进行观测和识别。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述橡胶颗粒来自橡胶植物乳液。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,所述橡胶植物为橡胶树或者橡胶草,例如,选自由巴西橡胶树、蒲公英、刺莴苣、无花果和银胶菊组成的组中的任意一种,优选橡胶草。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其特征在于,所述标记免疫学识别技术为免疫电镜技术、酶联免疫吸附法、荧光显微镜方法、放射性免疫标记技术、蛋白或基因芯片法或者基于侧流免疫原理的试纸条法。

5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其特征在于,所述免疫学识别技术为免疫电镜技术。

6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 以取自橡胶植物的橡胶乳液作为待测样品,使其中的小橡胶颗粒蛋白(SRPP)与第一抗体充分接触,使两者结合;

(2) 使标记物标记过的第二抗体与已标记第一抗体的待测样品充分接触,使两者结合,得到抗体标记样品;

(3) 对抗体标记样品进行观测和识别。

7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第一抗体为源自于小橡胶粒子蛋白的抗体,优选为鼠源小橡胶粒子蛋白抗体,所述第二抗体为第一抗体的抗体。

8. 如权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法,其特征在于,所述第二抗体为金标记抗体。

9. 如权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1) 使四氧化锇与采集自橡胶植物(优选橡胶草)的橡胶乳液于室温下固定 1 小时,得到经四氧化锇固定的橡胶乳液,然后滴一小滴将该所述经四氧化锇固定的橡胶乳液至聚乙烯醇缩甲醛化的镍网上并风干;

(2) 在样品与第一抗体结合之前,将经风干的镍网依次浸泡在去离子水、PBS 缓冲液和含有牛血清蛋白(BSA)、Triton100 的 PBS 缓冲液中;

(3) 使所述镍网与第一抗体在 37℃ 充分结合 120 分钟;

(4) 取出所述镍网,依次滴加含有脱脂奶粉和 Tween 20 的 PBS 缓冲液、PBS 缓冲液;

(5) 使所述镍网与第二抗体在室温下充分结合 2 小时;

(6) 将镍网依次用 TBS-Tween 20、TBS 洗涤,最后用去离子水洗涤 4 次;

(7) 将镍网风干后使用透射电镜进行观测。

10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法在橡胶植物优选橡胶草上针对橡胶产量进行的品系筛查中的应用。

11. 权利要求 10 所述的应用,其中,所述品系筛查是定性筛查和 / 或定量筛查。

一种天然橡胶颗粒观测方法及其在橡胶植物品系筛查中的应用

【技术领域】

[0001] 本发明涉及利用标记免疫学识别技术的筛查橡胶植物品系的方法，特别是利用标记免疫电镜技术筛查蒲公英、刺莴苣、无花果、银胶菊等橡胶植物品系（特别是橡胶草品系）的方法。

【背景技术】

[0002] 橡胶植物的橡胶乳液中包含橡胶颗粒，天然橡胶分子即在橡胶颗粒的表面合成。小橡胶颗粒蛋白 (SRPP) 是橡胶颗粒表面的一种跟天然橡胶合成紧密相关的膜蛋白，其与橡胶植物的产胶能力成正相关关系（参见 Oh, S. K. ;Kang, H. ;Shin, D. H. ;Yang, J. ;Chow, K. S. ;Yeang, H. Y. ;Wagner, B. ;Breiteneder, H. ;Han, K. H. J. Biol. Chem. 1999, 274, 17132 – 17138.）。因此通过观测一种橡胶植物乳液中的 SRPP 即可预测该种橡胶植物的产胶能力。

[0003] 橡胶草是多年生草本植物，包括菊科蒲公英等。橡胶草含有天然橡胶乳液，能制造天然橡胶。我国面积广大，从温带到亚热带种都可种植橡胶草。因此，中国研究机构已开始研究从橡胶草上采集天然胶乳，以制备天然橡胶。但是，橡胶草中含胶量普遍较低。需要从野生的橡胶草中筛选出天然乳胶含量高的橡胶草品系和株，进行人工培育，以大规模推广种植。因此寻找一种橡胶草品系的筛查或筛选的方法，无论从经济意义还是我国的橡胶安全的角度来说具有重大意义。

[0004] 普通的电子显微镜可以实现高放大率和高解析度的颗粒物形态分析，例如，使用扫描电子显微镜和透射电子显微镜，可以清晰地表征纳米颗粒物的大小、形态及其分布特征，从而为相关领域的重要研究和应用奠定方法学基础。

[0005] 普通的电子显微术是通过将橡胶植物乳液样品作喷金或于金属网上固定处理而进行后续的电镜观察，在良好的工作条件下，普通的电子显微术可获得较为清晰的颗粒物电镜图片。

[0006] 现有技术中，应用普通的电子显微术可以直接观察到橡胶植物乳液中的颗粒物。但是，由于橡胶植物乳液中可能同时含有多类蛋白、树脂、橡胶分子以及其他颗粒，在普通电子显微镜下这些颗粒显示出类似的图像，所以普通电子显微镜无法区分橡胶植物乳液中的橡胶颗粒，即普通的电子显微术不具有特异性，无法确证所观察到的颗粒物是否为天然橡胶颗粒。

[0007] 标记免疫技术是使用放射性核素、荧光素、酶、纳米金颗粒、量子点等标记物质，结合特异性的抗原 - 抗体反应，而进行的特异性分子识别手段。

[0008] 标记免疫技术中，标记免疫电镜技术是将抗原 - 抗体特异性分子识别反应与高放大倍率和高解析度的电子显微术相结合，标记免疫电子显微技术在临床诊断、疾病治疗及生理病理研究等领域有着非常广泛的应用，近年来，随着标记技术的进步和电子显微相关设备的不断更新，标记免疫电镜技术的研究领域不断拓展，应用领域也日趋广泛。

【发明内容】

[0009] 【发明所要解决的课题】

[0010] 本发明所要解决的问题是普通的电子显微镜无法区分橡胶植物乳液中的橡胶颗粒，即普通的电子显微术不具有特异性，无法确证所观察到的颗粒物是否是所期望的目标天然橡胶颗粒，无法判断橡胶植物的产胶能力。

[0011] 【解决课题的手段】

[0012] 本发明基于橡胶颗粒表面的小橡胶颗粒蛋白，利用标记免疫识别技术，特异地识别橡胶植物乳液中的橡胶颗粒，判断橡胶植物乳液中的橡胶颗粒含量高低，并通过观察橡胶蛋白标记物的密度分布，快速预测和判断橡胶植物的产胶能力高低，解决产胶橡胶草品系筛查的关键性技术问题。

[0013] 具体地说，本发明解决课题的手段如下：

[0014] 1. 一种观测橡胶颗粒的方法，其特征在于，所述方法利用标记免疫学识别技术进行观测和识别。

[0015] 2. 如项目 1 所述的方法，其特征在于，所述橡胶颗粒来自橡胶植物乳液。

[0016] 3. 如项目 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述橡胶植物为橡胶树或者橡胶草，例如，选自由巴西橡胶树、蒲公英、刺莴苣、无花果和银胶菊组成的组中的任意一种。

[0017] 4. 如项目 1 至 3 中任一项所述的方法，其特征在于，所述标记免疫学识别技术为免疫电镜技术、酶联免疫吸附法、荧光显微镜方法、放射性免疫标记技术、蛋白或基因芯片法或者基于侧流免疫原理的试纸条法。

[0018] 5. 如项目 1 至 4 中任一项所述的方法，其特征在于，所述免疫学识别技术为免疫电镜技术。

[0019] 6. 如项目 1 至 5 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

[0020] (1) 以取自橡胶植物的橡胶乳液作为待测样品，使其中的小橡胶颗粒蛋白 (SRPP) 与第一抗体充分接触，使两者结合；

[0021] (2) 使标记物标记过的第二抗体与已标记第一抗体的待测样品充分接触，使两者结合，得到抗体标记样品；

[0022] (3) 对抗体标记样品进行观测和识别。

[0023] 7. 如项目 1 至 6 中任一项所述的方法，其特征在于，所述第一抗体为源自于小橡胶粒子蛋白的抗体，优选为鼠源小橡胶粒子蛋白抗体，所述第二抗体为第一抗体的抗体。

[0024] 8. 如项目 1 至 7 中任一项所述的方法，其特征在于，所述第二抗体为金标记抗体。

[0025] 9. 如项目 1 至 8 中任一项所述的方法，其特征在于，所述方法包括如下步骤：

[0026] (1) 使四氧化锇与采集自橡胶植物的橡胶乳液于室温下固定 1 小时，得到经四氧化锇固定的橡胶乳液，然后滴一小滴将该所述经四氧化锇固定的橡胶乳液至聚乙烯醇缩甲醛化的镍网上并风干；

[0027] (2) 在样品与第一抗体结合之前，将经风干的镍网依次浸泡在去离子水、PBS 缓冲液和含有牛血清蛋白 (BSA)、Triton100 的 PBS 缓冲液中；

[0028] (3) 使所述镍网与第一抗体在 37℃充分结合 120 分钟；

[0029] (4) 取出所述镍网，依次滴加含有脱脂奶粉和 Tween 20 的 PBS 缓冲液、PBS 缓冲

液；

- [0030] (5) 使所述镍网与第二抗体在室温下充分结合 2 小时；
- [0031] (6) 将镍网依次用 TBS-Tween 20、TBS 洗涤，最后用去离子水洗涤 4 次；
- [0032] (7) 将镍网风干后使用透射电镜进行观测。
- [0033] 10、如项目 1 至 9 中任一项所述的方法在橡胶植物尤其是橡胶草上针对橡胶产量进行的品系筛查中的应用。
- [0034] 11、项目 10 所述的应用，其中，所述品系筛查是定性筛查和 / 或定量筛查。

【发明的效果】

[0036] 本发明利用标记免疫识别技术，特异性地识别橡胶植物乳液中的橡胶颗粒，并通过观察橡胶蛋白标记物的密度分布，实现了快速定量判断橡胶植物乳液中的橡胶颗粒含量高低及快速判断橡胶植物产胶能力高低，解决了产胶橡胶草品系筛查的关键性技术问题。

【附图说明】

- [0037] 图 1 是实施例 1(有第一抗体)的透射电镜照片。
- [0038] 图 2 是图 1 的放大图。
- [0039] 图 3 是比较例 1(无第一抗体)的透射电镜照片。
- [0040] 图 4 是实施例 2(有第一抗体)的透射电镜照片。
- [0041] 图 5 是比较例 2(无第一抗体)的透射电镜照片。
- [0042] 图 6 是胶体金免疫电镜原理示意图。

【具体实施方式】

[0043] 本发明的利用标记免疫技术特异性地识别橡胶植物乳液中的橡胶颗粒的方法可以适用于橡胶树、蒲公英、刺葛、无花果或者银胶菊。本发明的方法更适用于橡胶草，特别适用于蒲公英。

[0044] 本发明的方法包括如下步骤：

[0045] (1) 以提取出的橡胶乳液作为待测样品，使其中的 SRPP 与第一抗体充分接触，使两者结合；

[0046] (2) 使标记物标记的第二抗体与待测样品充分接触，使两者结合；

[0047] (3) 使用识别技术观察、识别天然橡胶颗粒。

[0048] 更具体地说，本发明的方法包括如下步骤：

[0049] (1) 将利用上述过膜法采集和纯化的橡胶植物乳液使用 1 质量% 四氧化锇溶液（四氧化锇溶于 50mM 二甲肿酸钠缓冲液中），置于室温下 1 小时固定，滴一小滴四氧化锇溶液至聚乙烯醇缩甲醛化的镍网上风干；

[0050] (2) 在第一抗体结合之前（即，第一抗体与样品（带有橡胶颗粒的镍网）结合之前），将镍网依次浸泡在去离子水、PBS 缓冲液和含有 1 质量% 牛血清蛋白 (BSA)、0.5 体积% Triton100 的 PBS 缓冲液中（在各液体中分别浸泡 5min）

[0051] (3) 将 SRPP 抗体（鼠源）(第一抗体)1:200 稀释，得到稀释液，将镍网在 37℃ 下充分接触 120min 所述稀释液，使载在镍网上的样品与第一抗体结合；

[0052] (4) 取出载有样品的镍网，用移液器依次滴加含有 2 质量% 脱脂奶粉和 0.5 体积%

Tween 20 的 PBS 缓冲液 (50 μ L)、PBS 缓冲液 (50 μ L), 镍网为多孔网, 直径大约有 4~5mm, 滴加后样品覆盖在镍网的整个表面。

[0053] (5) 将金标记的第二抗体 (以第一抗体为抗原得到的羊源抗体) 1:20 (体积比) 稀释, 得到稀释液, 将载有样品的镍网与含有第二抗体的所述稀释液在室温下接触 2 小时, 使已经结合在样品上的第一抗体与第二抗体结合;

[0054] (6) 将第 (5) 步骤得到的吸附有样品的镍网依次用 TBS-Tween 20 (用量 50 μ L), TBS (用量 50 μ L) 洗涤, 最后用去离子水洗涤 (用量 50 μ L) 4 次;

[0055] (7) 将镍网上的样品风干, 将镍网装上样品杆使用透射电子显微镜 (TEM) 在 60/80kV 的加速电压下观察橡胶颗粒。

[0056] 所述第一抗体可以是, 例如, 抗 SRPP 抗体 (小橡胶粒子蛋白抗体, 鼠源)。所述第二抗体是第二抗体为第一抗体的抗体, 例如, 以第一抗体为抗原得到的羊源抗鼠抗体。所述标记物可以是, 例如, 纳米金或其他标记物。

[0057] 所述识别技术可以是各种直接或间接图像识别技术, 例如, 使用各种电子显微镜 (透射电子显微镜、扫描电子显微镜等)。所述标记免疫学识别技术优选为免疫电镜技术。所述电镜优选为透射电子显微镜。

[0058] 所述橡胶植物为橡胶树或者橡胶草, 例如, 选自由巴西橡胶树、蒲公英、刺莴苣、无花果和银胶菊组成的组中的任意一种。

[0059] 对植物橡胶乳液可以过膜法处理, 例如, 使用 0.22 μ m 滤膜进行处理, 以除去植物橡胶乳液中的杂质。过膜法使用针管和滤膜。过膜法可以例如采用如下方式进行: 将天然橡胶胶乳抽到针管 (例如塑料针管), 取下针头 (例如金属针头), 在针管的针头处接上一个孔径为微米级的滤膜 (例如, 0.22um 孔径), 然后将橡胶胶乳推出去, 即可达到过滤效果。过膜法具有步骤简单、样品用量少的优点。

[0060] 过膜法所用的膜可以是对溶液和抗体呈惰性的高分子膜, 例如, 聚四氟乙烯膜、聚偏氟乙烯膜、聚醚砜膜等。所述膜的孔径可以是 0.45 μ m 以下, 优选 0.22 μ m 左右。

[0061] 胶体金免疫电镜的原理如图 6 所示。具体地说, 天然橡胶分子是在天然橡胶粒子的表面合成的, SRPP 在天然橡胶粒子的表面, 与天然橡胶的合成紧密相连。利用 SRPP 单克隆抗体 (第一抗体) 与 SRPP 特异结合, 再利用金标二抗与第一抗体特异结合, 最终通过 TEM 观测金纳米粒子的分布和密度来实现对 SRPP 进行表征, 同时特异性地表征天然橡胶颗粒。

[0062] 【实施例】

[0063] 以下以蒲公英橡胶乳液为例子, 具体说明本发明的方法。

[0064] 【材料与试剂】

[0065] SRPP 单克隆抗体试剂 (商品名 Mouse Monoclonal Antibody) 购自 Icosagen AS (Tartu, Estonia) 公司。金标记第二抗体购自 Sigma 公司。所有溶液均用超纯水配制并在使用前用孔径 0.22 μ m 的下述滤膜过滤。

[0066] 滤膜是天津津腾公司生产的水系膜, 材料是 PES (聚醚砜), 原材料膜是德国 MEMBRANA 公司进口膜, 孔径是 0.22um。

[0067] 磷酸盐 (PBS) 缓冲液、四氧化锇、BSA、Triton 100、脱脂奶粉、Tris、HCl、山梨糖醇、NaCl、MgCl₂、DTT 购自 Sigma 公司。

[0068] 聚乙烯醇缩甲醛化的镍网购自北京新兴百瑞技术有限公司。

[0069] TEM 观察用 JEOL JEM-1230。

[0070] Taraxacum sp. 1、Taraxacum sp. 2 两种蒲公英橡胶草均是北京城郊野外品系。

[0071] 其他试剂购自 Sigma 公司。

[0072] 【植物橡胶乳液的采集和纯化】

[0073] 对待测的植物橡胶乳液进行 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 过膜处理, 以除去植物橡胶乳液中的杂质。过膜法使用滤膜过滤植物橡胶乳液。过膜法使用针管和滤膜。过膜法可以例如采用如下方式进行: 将天然橡胶胶乳抽到塑料针管, 取下金属针头, 在针管的针头处接上一个孔径为微米级的滤膜 ($0.22\text{ }\mu\text{m}$ 孔径), 然后将橡胶胶乳推出去, 即可达到过滤效果。过膜法具有步骤简单、样品用量少的优点。

[0074] 过膜法所用的膜可以是对溶液和抗体呈惰性的聚偏氟乙烯膜。

[0075] 【实施例 1】

[0076] (1) 将利用上述过膜法采集和纯化的 Taraxacum sp. 1 蒲公英橡胶乳液使用 1 质量% 四氧化锇溶液 (四氧化锇溶于 50mM 二甲胂酸钠缓冲液中), 置于室温下 1 小时固定, 滴一小滴四氧化锇溶液至聚乙烯醇缩甲醛化的镍网上风干;

[0077] (2) 在第一抗体结合之前 (即, 第一抗体与样品 (带有橡胶颗粒的镍网) 结合之前), 将镍网依次浸泡在去离子水、PBS 缓冲液和含有 1 质量% 牛血清蛋白 (BSA)、0.5 体积% Triton100 的 PBS 缓冲液中 (在各液体中分别浸泡 5min)

[0078] (3) 将 SRPP 抗体 (鼠源) (第一抗体) 1:200 稀释, 得到稀释液, 将镍网在 37°C 下充分接触 120min 所述稀释液, 使载在镍网上的样品与第一抗体结合;

[0079] (4) 取出载有样品的镍网, 用移液器依次滴加含有 2 质量% 脱脂奶粉和 0.5 体积% Tween 20 的 PBS 缓冲液 ($50\text{ }\mu\text{L}$)、PBS 缓冲液 ($50\text{ }\mu\text{L}$), 镍网为多孔网, 直径大约有 4–5mm, 滴加后样品覆盖在镍网的整个表面。

[0080] (5) 将金标记的第二抗体 (以第一抗体为抗原得到的羊源抗体) 1:20 (体积比) 稀释, 得到稀释液, 将载有样品的镍网与含有第二抗体的所述稀释液在室温下接触 2 小时, 使已经结合在样品上的第一抗体与第二抗体结合;

[0081] (6) 将第 (5) 步骤得到的吸附有样品的镍网依次用 TBS-Tween 20 (用量 $50\text{ }\mu\text{L}$), TBS (用量 $50\text{ }\mu\text{L}$) 洗涤, 最后用去离子水洗涤 (用量 $50\text{ }\mu\text{L}$) 4 次;

[0082] (7) 将镍网上的样品风干, 将镍网装上样品杆使用透射电子显微镜 (TEM) 在 60/80kV 的加速电压下观察橡胶颗粒。

[0083] 在实施例 1 中可以特异地明确地观察到带有纳米金粒子的橡胶颗粒。

[0084] 【比较例 1】

[0085] 除省去实施例 1 的第 (3) 步骤以外, 其他步骤与实施例 1 相同。

[0086] 在比较例 1 中无法观察到特异地带有纳米金粒子的橡胶颗粒。

[0087] 【实施例 2】

[0088] 除橡胶乳液换为 Taraxacum sp. 2 蒲公英橡胶乳液以外, 采用与上述实施例 1 相同的步骤进行观测、识别。

[0089] 在实施例 2 中可以特异地观察到带有纳米金粒子的橡胶颗粒。

[0090] 【比较例 2】

[0091] 除橡胶乳液换为 Taraxacum sp. 2 蒲公英橡胶乳液以外, 采用与上述比较例 1 相同

的步骤进行观测、识别。

[0092] 在比较例 2 中无法观察到特异地带有纳米金粒子的橡胶颗粒。

[0093] 经上述两种实施例和比较例的对照,本发明的方法能够特异性地对目标橡胶颗粒进行观察、定性、定量筛查,并通过橡胶颗粒上蛋白标记物的密度分布快速判断目标橡胶植物的产胶能力高低。

[0094] 另外,可以通过本发明的方法观测已知产胶能力的橡胶植物(例如巴西橡胶树)乳液中的橡胶颗粒,然后再与目标橡胶植物乳液中的橡胶颗粒密度分布进行比较,定量预测目标橡胶植物的产胶能力。

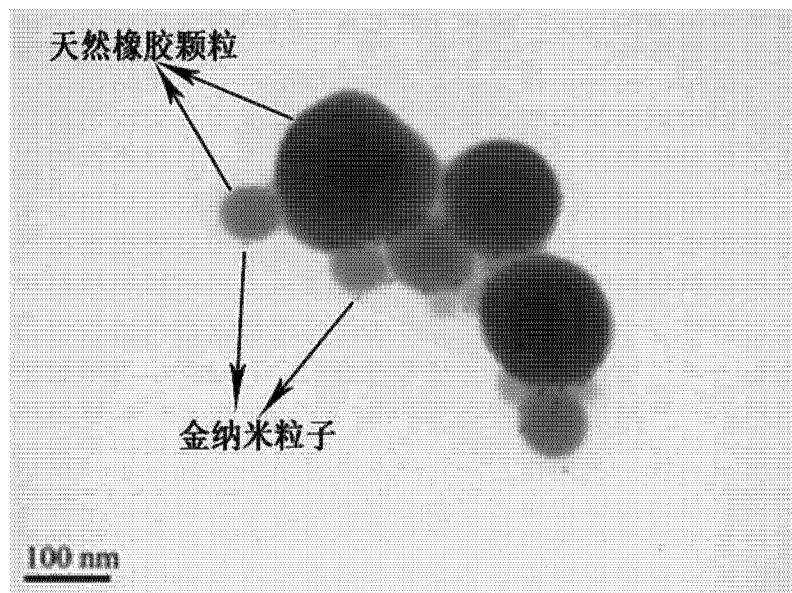


图 1

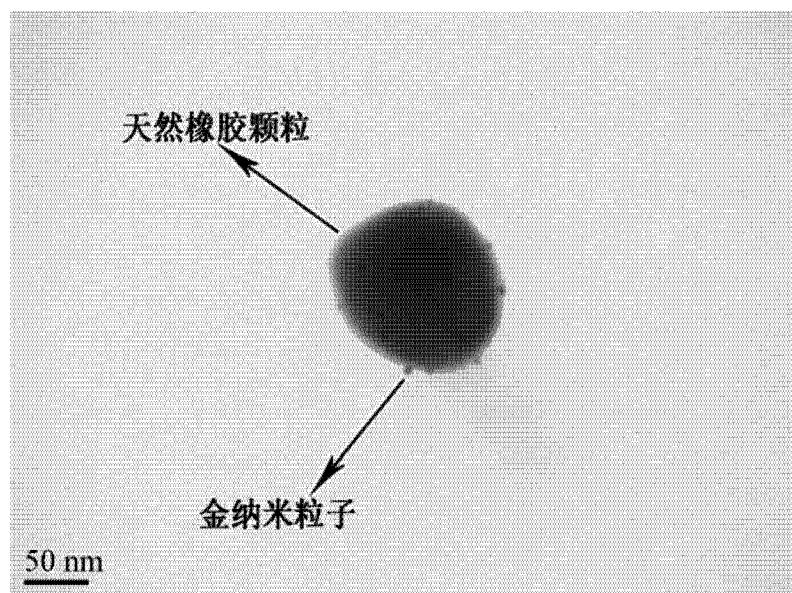


图 2

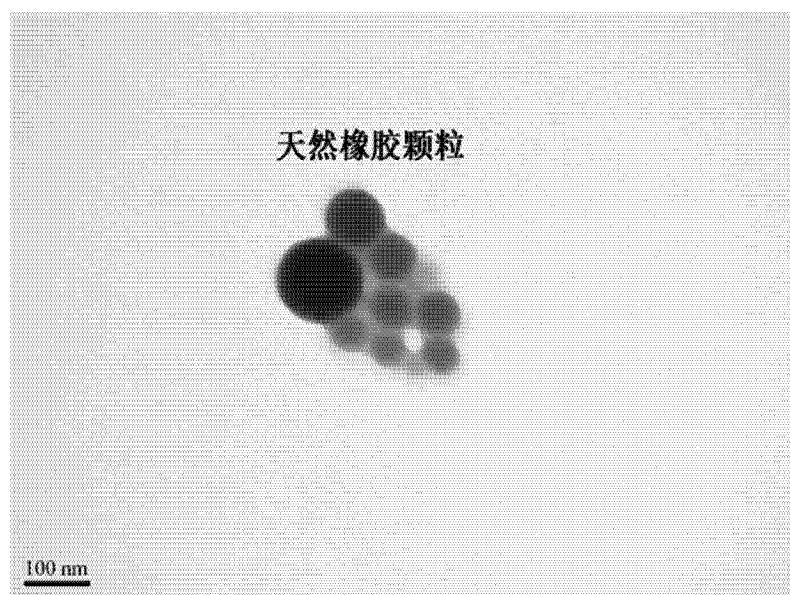


图 3

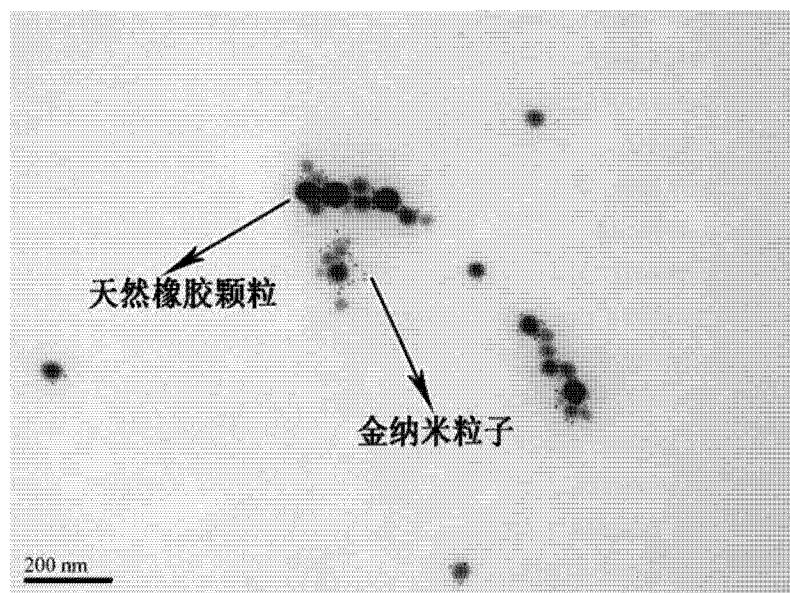


图 4

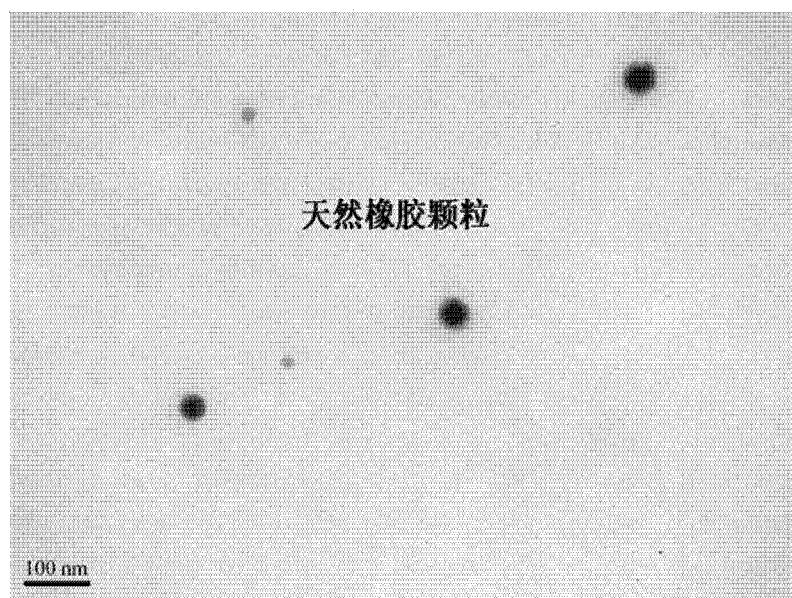


图 5

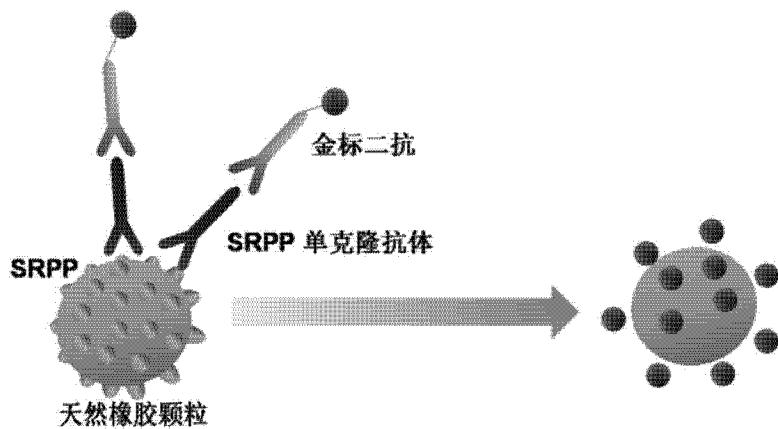


图 6

专利名称(译)	一种天然橡胶颗粒观测方法及其在橡胶植物品系筛查中的应用		
公开(公告)号	CN104865376A	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201510246529.6	申请日	2015-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	北京化工大学 德州玲珑轮胎有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京化工大学 德州玲珑轮胎有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京化工大学 德州玲珑轮胎有限公司		
[标]发明人	王赛 王峰 董益阳 张继川 张立群 赵永升 邢涛 祝静 孙艳波 聂秋海		
发明人	王赛 王峰 董益阳 张继川 张立群 赵永升 邢涛 祝静 孙艳波 聂秋海		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
代理人(译)	张璐 林潮		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种橡胶颗粒观测方法及该方法在高产胶量橡胶植物尤其是高产胶量橡胶草的品系筛查中的应用。本发明方法的特征在于，所述方法利用标记免疫学识别技术进行观测。本发明方法可以对天然橡胶颗粒进行定性和定量观测，由此可以快速有效地对高产胶量橡胶植物尤其是高产胶量橡胶草品系进行筛查。

