



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105866413 A

(43)申请公布日 2016.08.17

(21)申请号 201610109563.3

G01N 33/532(2006.01)

(22)申请日 2016.02.28

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

申请人 无锡福阳生物科技有限公司

(72)发明人 寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿
武爱波 徐伟

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212

代理人 金祺

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

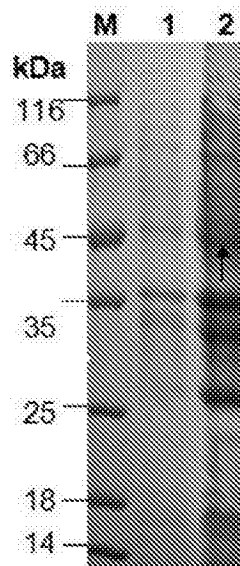
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

检测转基因蛋白g10-epsps的胶体金速测试纸及其使用法

(57)摘要

本发明公开了一种检测转基因蛋白R1-EPSPS的胶体金速测试纸,包括设置在底板上的样品垫、金标垫、包被质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸样垫;所述金标垫上涂覆有胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述检测线为包被有鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述质控线为包被有抗鼠IgG二抗。本发明还公开了上述胶体金速测试纸的使用方法:将速测试纸垂直插入待测样品中;8~10min后,进行观测;只出现C线,判断样品为阴性;同时出现T线和C线,判定样品为阳性。采用本发明的手持式胶体金速测试纸,能够快速、现场、灵敏地检测样品中的转基因蛋白g10-epsps。



1. 检测转基因蛋白R1-EPSPS的胶体金速测试纸,包括设置在底板上的样品垫、金标垫、包被质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸样垫;其特征在于:所述金标垫上涂覆有胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述检测线为包被有鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述质控线为包被有抗鼠IgG二抗。

2. 根据权利要求1所述的胶体金速测试纸,其特征在于:

鼠抗g10-epsps单克隆抗体为通过用g10-epsps重组蛋白免疫BALB/c小鼠,然后通过细胞融合、克隆化筛选制备得到单克隆抗体细胞株,接着制备小鼠腹水,经过纯化得到。

3. 根据权利要求2所述的胶体金速测试纸,其特征在于:g10-epsps为将G1中的g10-epsps基因经过优化后构建入大肠杆菌表达体系,重组表达纯化得到。

4. 根据权利要求1、2或3所述的胶体金速测试纸,其特征在于:胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的制备法包括以下步骤:

1)、制备20~30nm的胶体金;

2)、抗体标记:

取1ml的胶体金,调节pH到8.0,加入80 μ g的g10-epsps鼠单克隆抗体,混合均匀,室温反应30~50min;加入BSA至终浓度为0.1%,静置20~40min;

然后进行标记抗体纯化,得胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

5. 如权利要求1~4任一所述的胶体金速测试纸的使用方法,其特征在于:

将速测试纸垂直插入待测样品中;

8~10min后,进行观测;只出现C线,判断样品为阴性;同时出现T线和C线,判定样品为阳性。

检测转基因蛋白g10-epsps的胶体金速测试纸及其使用法

技术领域

[0001] 本发明涉及转基因蛋白检测技术领域,尤其涉及一种检测转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸。

背景技术

[0002] 发明人所在的研究组前期研究了从假单胞杆菌中克隆到抗除草剂的EPSPS基因(g10-epsps)。EPSP合成酶(5-enoIpyruvyl-shikimate-3-phosphatesynthase,EPSPS)是生物体内芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸生物合成过程中的关键性酶;草甘磷是通过抑制EPSP合成酶的活性而阻断芳香族氨基酸的合成最终导致受试植物死亡。但是某些细菌的EPSP合成酶的活性不被草甘磷所抑制,所以细菌EPSPS基因的表达可以使植物免受除草剂的伤害。将除草剂抗性基因EPSPS转入大豆,旨在培育具抗草甘磷优良特性的转基因大豆,提高大豆生产中的田间除草效果,降低生产成本。

[0003] 该研究组利用从假单胞杆菌中克隆的抗除草剂的EPSPS基因,构建了植物组成型表达载体pSOY19,由35S启动子驱动,可以为转基因植物提供草甘磷抗性。pSOY19质粒中只含有1种能在植物细胞中表达的基因:细菌EPSPS,位于CaMV 35S启动子的控制下。抗除草剂基因表达质粒为9557bp。插入序列EPSPS基因全长1321bp,编码一个含有440个氨基酸的多肽。通过农杆菌介导法,已将EPSPS外源基因转化大豆华春3号和Jack品种并获得转EPSPS基因的抗除草剂转基因大豆材料。

[0004] 目前转基因蛋白的常规检测方法是PCR,但是PCR方法对场地、仪器、技术人员的要求比较高,样本处理复杂,不适合大量的筛选检测。有部分转基因蛋白已经可以通过速测试纸和ELISA试剂盒的方法进行检测,但是g10-epsps为一个新引进的转基因蛋白,目前尚无该方面的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种检测转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸及其使用法,利用本发明能够快速、现场、灵敏地检测样品中的转基因蛋白g10-epsps。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供以下一种检测转基因蛋白R1-EPSPS的胶体金速测试纸(为手持式胶体金速测试纸),包括设置在底板上的样品垫、金标垫(即,标记垫)、包被质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸样垫;所述金标垫上涂覆有胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述检测线为包被有鼠抗g10-epsps单克隆抗体,所述质控线为包被有抗鼠IgG二抗(羊抗鼠IgG的二抗)。

[0007] 作为本发明的胶体金速测试纸的改进:

[0008] 鼠抗(特异性鼠抗)g10-epsps单克隆抗体为通过用g10-epsps重组蛋白免疫BALB/c小鼠,然后通过细胞融合、克隆化筛选制备得到单克隆抗体细胞株,接着制备小鼠腹水,经过纯化得到。

[0009] 作为本发明的胶体金速测试纸的改进:g10-epsps为将G1中的g10-epsps基因经过优化后构建入大肠杆菌表达体系,重组表达纯化得到。

[0010] 作为本发明的胶体金速测试纸的进一步改进:胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的制备法包括以下步骤:

[0011] 1)、制备20~30nm(较佳为25nm)的胶体金;

[0012] 2)、抗体标记:

[0013] 取1mL的胶体金,调节pH到8.0,加入80 μ g的g10-epsps鼠单克隆抗体(鼠抗g10-epsps单克隆抗体),混合均匀,室温反应30~50min;加入BSA至终浓度为0.1%(即,100mL中含有0.1g的BSA),静置20~40min;

[0014] 然后进行标记抗体纯化,得胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

[0015] 本发明的转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸的制备方法包括以下步骤:

[0016] 1)在底板板上从加样区开始依次为并排粘贴的玻璃纤维膜(即样品垫)和固定有胶体金标记抗体的金标垫、硝酸纤维素膜和吸样垫。

[0017] 2)金标垫上鼠抗g10-epsps单克隆抗体的涂覆量为5ng-50ng,硝酸纤维素膜上鼠抗g10-epsps单克隆抗体的量为0.4 μ g-1.2 μ g。

[0018] 3)试纸条干燥温度为37 $^{\circ}$ C,时间为30min。

[0019] 本发明还同时提供了上述胶体金速测试纸的使用方法:将速测试纸垂直插入待测样品中;

[0020] 8~10min后,进行观测;只出现C线,判断样品为阴性;同时出现T线和C线,判定样品为阳性。

[0021] 备注说明:检测线(T线),质控线(C线)。

[0022] 本发明的转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸的具体检测步骤及原理如下:

[0023] 首先将速测试纸垂直插入检测样品中,不超过图5中的箭头位置;样品溶液沿样品垫渗透至涂覆有胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的标记垫(金标垫),如果样品溶液中含转基因蛋白g10-epsps,那么g10-epsps蛋白将与标记垫上的鼠抗g10-epsps单克隆抗体结合,继续上行,并与NC膜上的鼠抗g10-epsps单克隆抗体结合,其余未结合的胶体金标记抗体与NC膜上的羊抗鼠IgG二抗结合,8-10min后,可于观察区中观察到检测区(即,检测线)的颜色变化,即出现阳性条带;如果样品溶液中不含转基因蛋白g10-epsps,那么检测区则观察不到阳性条带。而无论样品溶液中是否含转基因蛋白g10-epsps,当样品溶液到达硝酸纤维素膜时,金标试纸条上的鼠抗g10-epsps单克隆抗体均可与控制区包被的抗鼠IgG二抗结合,从而使硝酸纤维素膜上的C线显色。否则的话,需要重新进行实验(此属于公知常识)。

[0024] 因此,本发明转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸的结果判断规则为:

[0025] 阴性结果(-),只出现1条C线;

[0026] 阳性结果(+):同时出现T线和C线。

[0027] 本发明的转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸的对叶片、种子和散粮等复杂基质具有较好的抗干扰效果,可广泛应用于转基因蛋白g10-epsps的快速检测,具有

以下特有优势。

[0028] (1)操作简单,不需要专门的仪器设备,可方便的于田间等现场直接进行检测。

[0029] (2)检测时间短(5-8min);结果判定标准统一,即阴性结果(-),只出现1条C线;阳性(+):同时出现T线和C线。

[0030] 本发明的检测转基因蛋白g10-epsps的手持式胶体金速测试纸可针对叶片、种子和散粮等样品中转基因蛋白g10-epsps进行快速、现场和灵敏的检测。

附图说明

[0031] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0032] 图1是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的表达;

[0033] 1:诱导前;2:诱导后(约45KD)。

[0034] 图2是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的表达形式;

[0035] 1:上清;2:包涵体;3、全菌。

[0036] 图3是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的纯化效果;

[0037] 1:250mM咪唑洗脱液;2:150mM咪唑洗脱液;

[0038] 3:100mM咪唑洗脱液;4:50mM咪唑洗脱液。

[0039] 图4是SDS-PAGE检测g10-epsps蛋白的透析效果;

[0040] 1:50mM咪唑洗脱液。

[0041] 图5是本发明的转基因蛋白g10-epsps手持式胶体金速测试纸的结构示意图;

[0042] 其中:

[0043] 图A为测试纸的主视示意图;

[0044] 图B为图A的俯视示意图;

[0045] 图C为产品化的测试纸的结构示意图;

[0046] 图D为图C的侧视示意图。

具体实施方式

[0047] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明专利的技术方案。

[0048] 实施例1、EPSPS蛋白的表达纯化

[0049] (1)蛋白的小试表达

[0050] 1、载体构建

[0051] 根据蛋白序列(g10-epsps),合成基因序列,并构建入载体pET30a,得到pET30a-EPSPS阳性质粒。

[0052] 2、菌种活化:利用EMD Biosciences公司出售的商用的ET表达载体骨架,构建了g10-epsps-E阳性质粒,转化BL21(DE3),涂布LB固体培养基(卡那浓度50 μ g/mL)。次日,挑取单克隆菌落接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C培养12h-14h。

[0053] 3、小试表达:次日,菌种以1:50(v:v)接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C培养至OD=0.4-0.6,吸取1mL菌液离心处理后作为诱导前对照。4mL菌液加入浓度为0.8mM的IPTG,25 $^{\circ}$ C诱导表达6h后菌液8000rpm、4 $^{\circ}$ C离心1min,收集菌体。SDS-PAGE鉴定蛋白的形式,结果显示(图1)有明显目的蛋白的表达。

[0054] 4、蛋白表达形式的鉴定：上述表达的菌体(即，上述步骤所收集的菌体)加入1mL破碎液进行超声波裂解。裂解条件：温度冰浴、功率240W、超声2s、间隔2s、时间30min。将得到的全菌离心，12000rpm、4℃离心1min，收集上清和包涵体。SDS-PAGE鉴定蛋白表达形式，结果显示(图2)目的蛋白主要以可溶形式表达。

[0055] 图2中的“2：包涵体”即指上文中的沉淀；“3：全菌”即指上文中的离心前的破碎产物。

[0056] (2)蛋白的大量表达和纯化

[0057] 1、菌种活化：固体平板上挑取pET30a-EPSPS单克隆菌落接入5mL LB液体培养基(卡那浓度50μg/mL)，37℃培养12h-14h。

[0058] 2、小试表达：次日，菌种以1：50(v：v)接入800mLLB液体培养基(卡那浓度50μg/mL)，37℃培养至OD=0.4-0.6，加入浓度为0.8mM的IPTG，25℃诱导表达6h后菌液8000rpm、4℃离心15min，收集菌体。

[0059] 3、菌种裂解：加100mL破碎液进行超声波裂解。裂解条件：温度冰浴、功率240W、超声2s、间隔2s、时间15min。12000rpm、4℃离心15min，收集上清。

[0060] 4、上清纯化：收集的上清利用高亲和性NI树脂(即，Ni-NTA亲和层析树脂(镍柱))进行纯化，分别以50mM、100mM、150mM、200mM咪唑进行洗脱；

[0061] 收集流穿液、洗脱液。SDS-PAGE检测纯化效果，结果显示(图3)50mM咪唑洗脱时蛋白纯度最佳。用50mM，pH=8.0的Tris-HCl缓冲液将洗脱液中的咪唑透析去除，SDS-PAGE检测透析效果，结果显示(图4)蛋白透析后纯度和浓度均可行。经检测，最终目的蛋白纯度大于90%，浓度2mg/mL，蛋白量10mg。

[0062] (3)结果

[0063] pET30a-EPSPS蛋白诱导表达条件为：IPTG浓度0.8mM，诱导温度25℃，诱导时间6h。蛋白主要在上清表达，上清经NI柱纯化、透析去除咪唑，最终所得g10-epsps蛋白：浓度2mg/mL、纯度大于90%、蛋白10mg。

[0064] 实施例2、抗体制备

[0065] (1)单抗制备：

[0066] 1、免疫原制备：将表达纯化的蛋白与等体积的弗氏佐剂、YOULONG佐剂混合乳化均匀，成油包水状态，以备免疫小鼠。

[0067] 2、免疫策略：将蛋白免疫4只BaIb/c小鼠，皮下免疫3次，间隔4周，最后经ELISA检测，抗血清效价如下：

编号 效价

FL0293-1 1:243000

[0068] FL0293-2 1:243000

FL0293-3 1:243000

FL0293-4 1:243000

[0069] 3、细胞融合：最后一次免疫后两周，腹腔注射抗原(具体为g10-epsps蛋白表达纯化的蛋白)进行加强免疫，三天后进行细胞融合。将小鼠断颈处死，70%乙醇浸泡30min消毒，在超净台剪开腹腔，取出脾脏，磨碎，过80目筛网，得到脾细胞，加入SP2/0骨髓瘤细胞，

在PEG4000的作用下进行细胞融合。

[0070] 4、融合筛选:将融合好的细胞铺进96孔板,用HAT培养液进行培养,三天后换液,改用HT培养液培养。10天后,取细胞培养上清进行检测。使用间接ELISA方法进行筛选,OD值>阴性对照孔2.1倍的孔判断为阳性孔。

[0071] 间接ELISA方法主要包括以下步骤:

[0072] 1)、用0.1M,pH=9.6的碳酸盐缓冲液稀释表达纯化的蛋白至1 μ g/ml,加入96孔酶标板,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C反应3h或者4 $^{\circ}$ C静置过夜;

[0073] 2)、甩去板孔中液体,加入250 μ l洗涤缓冲液,静置30s,甩去板中液体,重复3次;

[0074] 3)、加入检测样本,每孔100 μ l,同时加入阳性对照(2中所取阳性小鼠血清)、阴性对照(免疫前小鼠血清)和空白对照(不加小鼠血清)37 $^{\circ}$ C反应45min;

[0075] 4)、重复步骤2);

[0076] 5)、加入HRP标记的羊抗鼠酶标二抗,每孔100 μ l,37 $^{\circ}$ C反应45min。

[0077] 5、克隆化与建株:使用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,10天后检测,将阳性克隆继续有限稀释法进行克隆化,直到得到的克隆都为阳性,可建立阳性细胞株。最终获得阳性细胞株5株。

[0078] 6、扩大培养:将建株的单克隆细胞扩大培养,并冻存于液氮中。

[0079] (2)腹水制备与纯化

[0080] 1、腹水制备:提前一周在小鼠腹腔注射矿物油,将一定数量(约 10^6)的细胞注射入小鼠腹腔,10天左右收集腹水,4000rpm离心,得上清即为单克隆抗体腹水。

[0081] 2、单克隆抗体纯化:腹水离心15min(4000rpm,室温),取上清10ml,在4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴缓慢加入饱和硫酸铵至半饱和,继续搅拌30min,离心30min(13000rpm,4 $^{\circ}$ C),弃上清;沉淀溶于约10ml IPBS(0.01M,pH7.4);在4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴缓慢加入饱和硫酸铵至33%,继续搅拌30min,离心30min(13000rpm,4 $^{\circ}$ C),弃上清;沉淀溶于适量10ml IPBS(0.01M,pH7.4),4 $^{\circ}$ C透析过夜,测定抗体含量,-20 $^{\circ}$ C冻存备用。硫酸铵沉淀后继续采用Protein G小柱进行纯化,新柱子先用5ml超纯水过柱,再用5ml 0.4M PB缓冲液(pH 7.0)平衡纯化小柱;抗体过柱,过程中要求缓慢过柱,以求抗体蛋白更好的结合在结合位点上;继续10ml 0.4M PB缓冲液(pH 7.0)平衡纯化小柱;5ml 0.1M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 2.7)洗脱结合位点上的抗体,并在洗脱液中加入1M Tris-HCl(pH 8.0)0.5ml中和甘氨酸,使pH保持为适合抗体保存的中性。

[0082] 从而得鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

[0083] 实施例3、胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体的制备法,具体包括以下步骤:

[0084] 1. 25nm胶体金的制备:

[0085] 1.1 准备:将500ml烧杯、20ml小烧杯、转子、棕色瓶、玻璃棒等洗净后放入酸缸中(重铬酸钾:浓硫酸:超纯水=120g:200ml:1000ml)浸泡24小时。取出先用自来水冲洗3-4次,再用超纯水冲洗3-4次,置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干备用。

[0086] 1.2 1%HAuCl₄水溶液的配制:用塑料称量匙称取1g氯金酸粉末于棕色瓶中,加入99ml超纯水充分溶解,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0087] 注:氯金酸粉末极易潮解,称取的时候要快速,剩余氯金酸粉末用铝箔袋密封保存。

[0088] 1.3 1%柠檬酸三钠水溶液的配制:称取1g柠檬酸三钠溶解于99ml超纯水中,混

匀。

[0089] 1.4 25nm胶体金的制备:量取99mI超纯水于烧杯中,加入1mI 1%HAuCl₄水溶液,置于恒温磁力搅拌器上搅拌混匀,开启加热至溶液沸腾,迅速加入2.5mI新制备的1%柠檬酸三钠水溶液,继续搅拌加热,溶液逐渐变为蓝黑色,然后紫黑,再加热出现红色,继续煮沸出现透明的橙红色,继续煮沸7-10min,自然冷却至室温,加超纯水使溶液至100mI。加入一定的PEG20000至其终浓度为0.02%—0.05%。倒入棕色瓶,4℃避光保存。

[0090] 2. 抗体标记:

[0091] 2.1 抗体的标记:取1mI制取好的胶体金,用1%的K₂CO₃调节PH到8.0,加入80μg上述纯化得到的g10-epsps鼠单克隆抗体,混合均匀,室温反应40min。加入BSA至终浓度为0.1%,静置30min。

[0092] 2.2 标记抗体纯化:先用低速(1500r/min)离心15分钟,弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀。然后用10000r/min离心30分钟。仔细吸出上清,沉淀物用0.1mI含1%BSA的0.1M PBS(PH7.4)复溶,加入5%叠氮钠至终浓度为0.05%,4℃保存。得胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体。

[0093] 实施例4、转基因蛋白g10-epsps免疫检测卡的制作

[0094] 在底板7上按照常规方式并排粘贴样品垫1和固定有胶体金标记的特异性单克隆抗体的金标垫2、醋酸纤维素膜3以及吸样垫4。在金标垫2上固定40ng鼠抗g10-epsps单克隆抗体,在醋酸纤维素膜3上的检测区固定0.8μg鼠抗g10-epsps单克隆抗体以及在控制区固定抗鼠IgG二抗0.4μg(分别作为检测线5和质控线6)。然后置于37℃真空干燥30min。

[0095] 实施例5、转基因蛋白g10-epsps免疫检测卡检测实际标准品的效果评价

[0096] ①样品杯中加入200μL空白样品液(pH 7.4,0.2moI/L PBS:8g氯化钠、3.35g十二水合磷酸氢二钠,0.2g磷酸二氢钾,0.2g氯化钾,双蒸水溶解定容至1L),将速测试纸插入样品杯,在室温条件下反应8分钟后在结果观察区中观察显色结果。结果表明,观察区中T线不显色,C线显色。

[0097] ②样品杯中加入100μL 0.1μg/mI的g10-epsps标准品(采用同上的PBS溶液稀释配成),按照与空白样品同样的操作步骤。结果表明,观察区中C线、T线同时显色。

[0098] g10-epsps标准品的获取方法为:

[0099] 大肠杆菌E.coIi中原核表达并通过亲和纯化的His-EPSPS(实施例2所得),N端带有6个His标签,其母液浓度为3mg/mI,用稀释液稀释到900ng/mI,3mL棕色玻璃瓶加入100μL 900ng/mI标准品,冷冻干燥机过夜抽干得到标准品冻干粉,即为g10-epsps标准品。

[0100] 实施例6、转基因蛋白g10-epsps免疫检测卡检测实际叶片样本的效果评价

[0101] ①样品杯中加入200μL阴性叶片样本提取液,按照与标准品同样的操作步骤。结果表明,观察区中只有控制线C线显色,检测线T线不显色。

[0102] ②样品杯中加入200μL阳性叶片样本提取液,按照与阴性样品同样的操作步骤。结果表明,观察区中控制线C线和检测线T线均显色。

[0103] 备注说明:

[0104] 1、叶片样本提取液为0.1M PBS缓冲液,叶片依据本行业常规的方法进行提取。

[0105] 2、上述阴性叶片样本经RT-PCR方法确认,g10-epsps含量无法检测到;而阳性叶片样本中g10-epsps经RT-PCR检测为阳性。

[0106] 实施例7、转基因蛋白g10-epsps免疫检测卡检测实际种子样本的效果评价

[0107] ①样品杯中加入200 μ L阴性种子样本提取液,按照与标品同样的操作步骤。结果表明,观察区中只有控制线C线显色,检测线T线不显色。

[0108] ②样品杯中加入200 μ L阳性种子样本提取液,按照与阴性样品同样的操作步骤。结果表明,观察区中控制线C线和检测线T线均显色。

[0109] 备注说明:

[0110] 1、种子样本提取液为0.1M PBS缓冲液。种子依据本行业常规的方法进行提取。

[0111] 2、上述阴性种子样本经RT-PCR法和ELISA方法法确认,g10-epsps含量无法检测到;而阳性种子样本中g10-epsps经RT-PCR检测为阳性,经ELISA方法检测含量在100-500 μ g/mL。

[0112] 实施例8、转基因蛋白g10-epsps免疫检测卡检测实际散粮样本的效果评价

[0113] ①样品杯中加入200 μ L阴性散粮样本提取液,按照与标品同样的操作步骤。结果表明,观察区中只有控制线C线显色,检测线T线不显色。

[0114] ②阴性散粮样本中加入0.2%阳性种子样本,得到阳性散粮样本,将该样本进行提取,样品杯中加入200 μ L阳性散粮样本提取液,按照与阴性样品同样的操作步骤。结果表明,观察区中控制线C线和检测线T线均显色。

[0115] 备注说明:

[0116] 1、种子样本提取液为0.1M PBS缓冲液。种子依据本行业常规的方法进行提取。

[0117] 2、上述阴性散粮样本经RT-PCR方法(目前已有的检测法)确认,g10-epsps表达量无法检测到;而阳性散粮样本中g10-epsps含量为经RT-PCR检测为阳性。

[0118] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

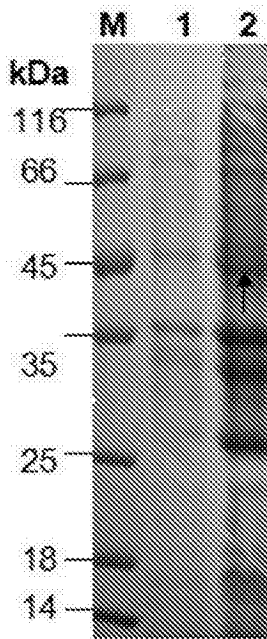


图1

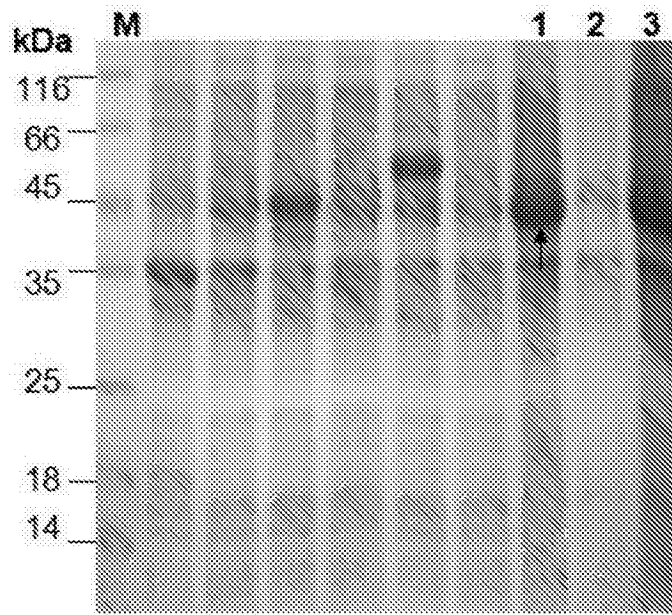


图2

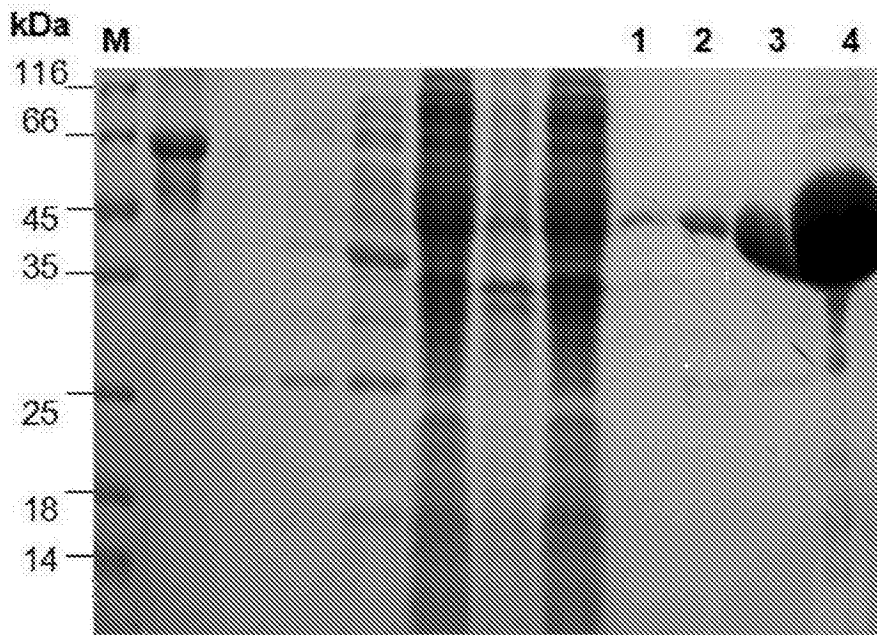


图3

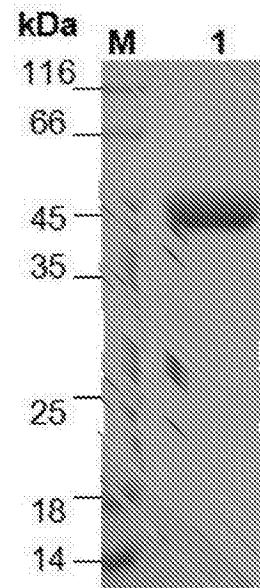
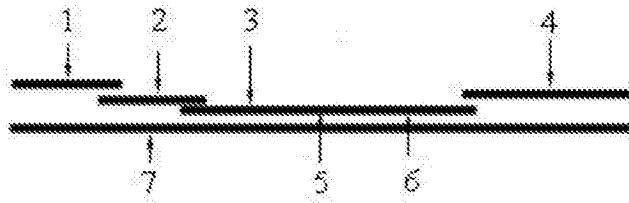
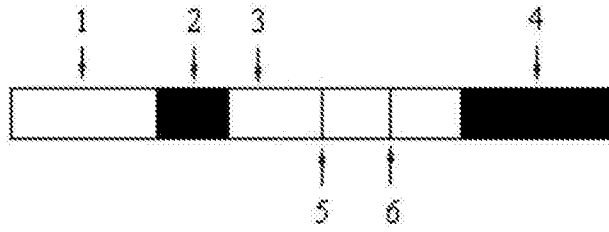


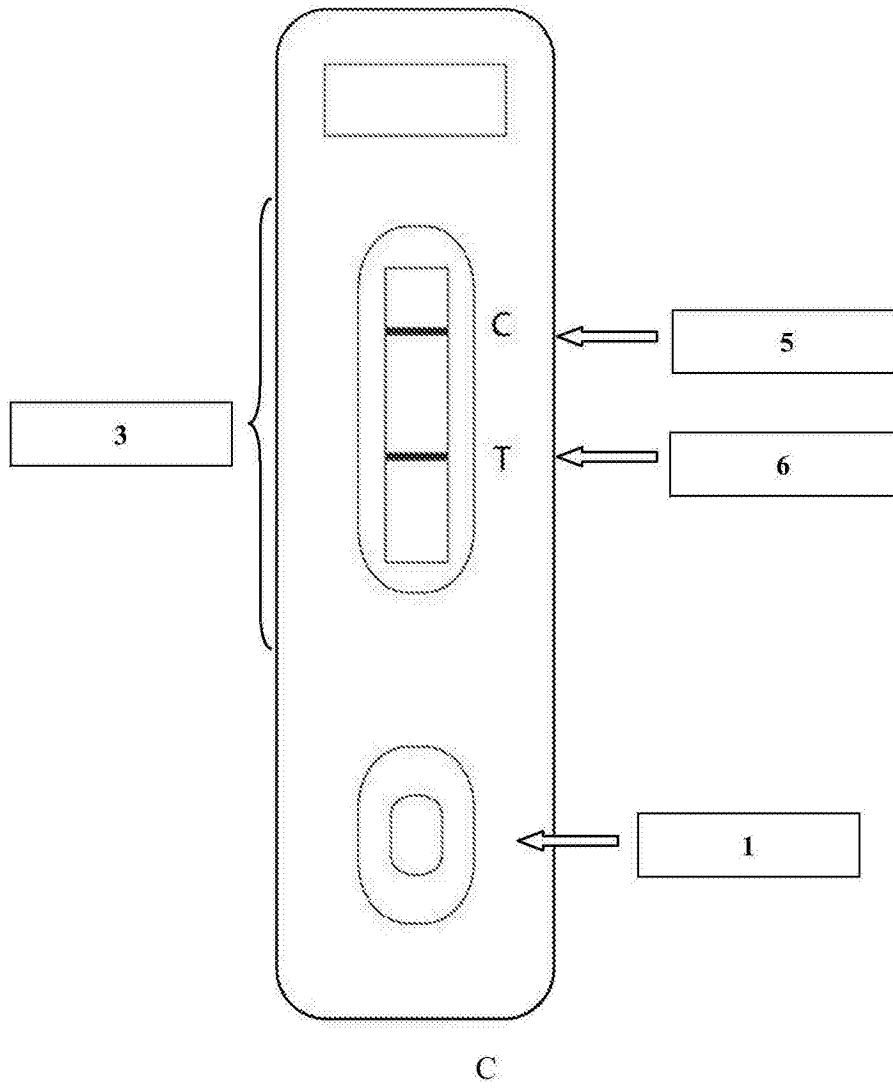
图4



A



B



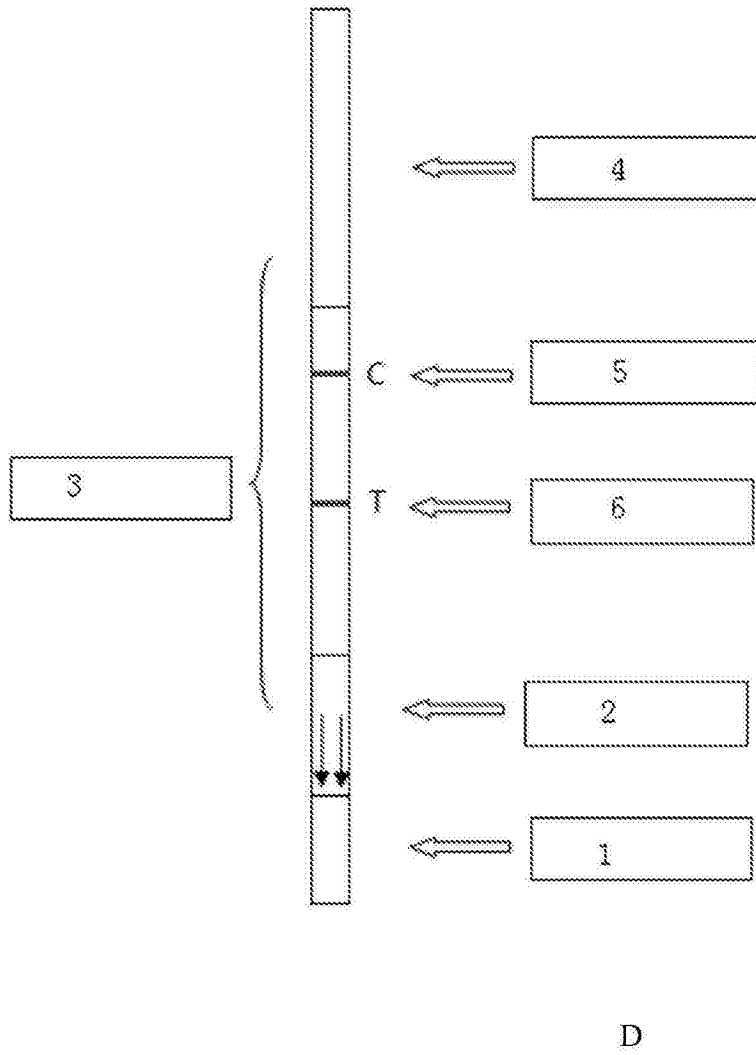


图5

专利名称(译)	检测转基因蛋白g10-epsps的胶体金速测试纸及其使用法		
公开(公告)号	CN105866413A	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201610109563.3	申请日	2016-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学 无锡福阳生物科技有限公司		
[标]发明人	寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿 武爱波 徐伟		
发明人	寿惠霞 杜娟 李林 陆玲鸿 武爱波 徐伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/573 G01N33/558 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/573 G01N2333/91182		
代理人(译)	金祺		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测转基因蛋白R1-EPSPS的胶体金速测试纸，包括设置在底板上的样品垫、金标垫、包被质控线和检测线的硝酸纤维素膜、吸样垫；所述金标垫上涂覆有胶体金标记的鼠抗g10-epsps单克隆抗体，所述检测线为包被有鼠抗g10-epsps单克隆抗体，所述质控线为包被有抗鼠IgG二抗。本发明还公开了上述胶体金速测试纸的使用方法：将速测试纸垂直插入待测样品中；8~10min后，进行观测；只出现C线，判断样品为阴性；同时出现T线和C线，判定样品为阳性。采用本发明的手持式胶体金速测试纸，能够快速、现场、灵敏地检测样品中的转基因蛋白g10-epsps。

