



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109781993 B

(45) 授权公告日 2021.04.06

(21) 申请号 201811612746.2

(22) 申请日 2018.12.27

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109781993 A

(43) 申请公布日 2019.05.21

(83) 生物保藏信息  
CGMCC No. 16697 2018.11.08  
CGMCC No. 16698 2018.11.08

(73) 专利权人 中国农业科学院生物技术研究所  
地址 100044 北京市海淀区中关村南大街  
12号

(72) 发明人 刘卫晓 李亮 董美 金芫军  
苗朝华 张哲

(74) 专利代理机构 北京知汇林知识产权代理事  
务所(普通合伙) 11794

代理人 董涛

(51) Int.Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/532 (2006.01)  
G01N 33/535 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)

审查员 周洋

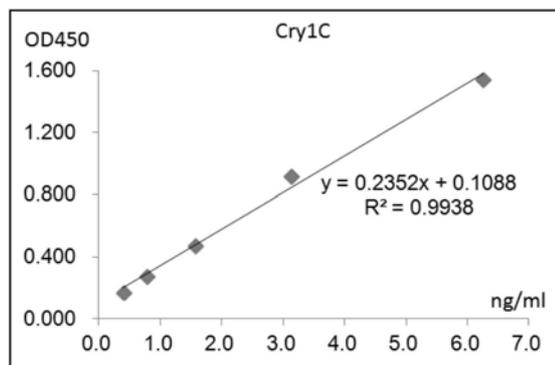
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

## (54) 发明名称

一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒

## (57) 摘要

本发明公开了属于生物工程技术领域的一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒,所述酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成。本发明的试剂盒操作简便、能同时快速检测大批样品,具有高灵敏度、高特异性的特点。



1. 一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成;

所述捕获抗体由保藏号为CGMCC No.16698的杂交瘤细胞株5E10 1C6分泌得到的,捕获抗体的检测范围0.39ng/mL-6.25ng/mL;所述检测抗体由保藏号为CGMCC

No.16697的杂交瘤细胞株3H3 1D2分泌得到。

2. 权利要求1所述定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒检测抗虫蛋白Cry1C的方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将权利要求1所述的样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液置于18-25℃,平衡至少30分钟;

2) 分别设标准品孔、待测样本孔,在每孔中加入标准品或待测样本进行温育,然后弃去液体,甩干后加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育,弃去孔内液体,洗涤甩干后每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液,进行温育,弃去孔内液体,洗涤甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,混匀在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度OD值;

3) 数据处理:将标准品及样本值减去S0孔数值后绘制曲线,如果设置复孔,则取其平均值计算,以标准品的浓度为纵坐标,OD值为横坐标,绘出标准曲线,根据样本OD值,由标准曲线查出相应的浓度。

3. 根据权利要求2所述定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒检测抗虫蛋白Cry1C的方法,其特征在于,所述步骤2)中生物素标记的检测抗体工作液是通过将生物素标记的检测抗体液用生物素标记的抗体稀释液按体积比1:100倍进行稀释得到的;所述辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液是通过将辣根过氧化物酶标记的亲合素用辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液按体积比1:100倍进行稀释得到的。

4. 根据权利要求2所述定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒检测抗虫蛋白Cry1C的方法,其特征在于,所述步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本80-120μL,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37℃温育1.5-2.5小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液80-120μL,覆上新的板贴,37℃温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板2-4次,每次浸泡1-3分钟,150-250μL/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液80-120μL,覆上新的板贴,37℃温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板4-6次,每次浸泡1-3分钟,150-250μL/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90μL,37℃避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50μL,终止反应。

## 一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程技术领域,具体涉及一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒。

### 背景技术

[0002] 苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种广泛存在的革兰氏阳性菌,该菌分泌的抗虫蛋白是目前主要的生物农药;分泌的抗虫蛋白按照氨基酸序列相似性被分为两类:Cry和Cry $\delta$ -内毒素。其中Cry蛋白对多种有害昆虫(如鳞翅目,双翅目,鞘翅目,线虫类和原生生物等)幼虫具有毒性。Cry毒素已经被转入多种农作物使其具有抗虫性。Cry1C蛋白是Cry毒素中的一种。目前转Cry基因的农作物主要有玉米、土豆、水稻、棉花等。

[0003] 转基因技术的发展与进步推动了生物学的发展。转基因食品虽然能够满足人们对产量、抗虫性等方面的要求,但同时也给人类的生活带来潜在的威胁,如某些基因导入宿主之后会使食品产生毒性,转基因食物产生过敏原,使人产生抗药性,食品的营养价值发生改变等。在进行转基因食品研究开发和商业化的同时,为了对转基因食品的安全性给予综合评估,使消费者能够快速区分转基因食品与天然食品,建立合适的方法对转基因食品中转基因成分进行鉴定与检测,能够促进农业转基因生物安全管理,保障人和动物以及微生物的安全,同时能够保护生态环境,促进农业转基因生物技术的进一步研究。为了对转基因作物或者其衍生物中Cry1C蛋白进行快速的定量分析,研究开发Cry1C酶联免疫试剂盒具有非常大的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒,能同时快速检测大批样品,且具有高灵敏度、高特异性。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供了一种定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒,所述酶联免疫试剂盒由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液和板贴组成。

[0006] 其中,样品处理液的配方为:

成分	用量
1M Tris, pH 7.5	500uL
1M NaCl	1.5mL
0.5M EDTA	20uL
50% glycerol	2mL
10% SDS	1mL
双蒸水 (DDH <sub>2</sub> O)	配成10mL
蛋白酶抑制剂 (Roche)	用时添加一片

1mM PMSF (苯甲基磺酰氟, Sigma)	用时添加50uL
--------------------------	----------

[0008] 生物素标记的检测抗体:100 $\mu$ g/mL生物素标记的Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/3H3 1D2) 鼠单抗 (PBS, 50%甘油) 溶液;

[0009] 标准品:2ng的His-Cry1C重组蛋白(冻干粉),所述His-Cry1C重组蛋白是通过将Cry1C编码基因进行扩增、测序,鉴定正确以后与pET28a质粒连接,将重组表达载体pET28a-Cry1C转化大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞,保存的重组蛋白Cry1C表达菌株复苏培养,用IPTG于16 $^{\circ}$ C过夜诱导表达蛋白,并通过重组蛋白纯化得到;

[0010] 辣根过氧化物酶标记的亲合素:1:40辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase) 标记的亲合素 (avidin) 母溶液 (金开瑞公司);

[0011] 生物素标记的抗体稀释液及辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液配方:

[0012]	稀释液 (100mL)	成分	用量
		0.1%的 $\text{NaN}_3$	0.1mL
		1%BSA	1g
		0.05%的吐温 20	0.05mL
		1 $\times$ PBS	定容至 100mL

[0013] 浓缩洗涤液:含有1.0%Tween-20的10 $\times$ PBS;

[0014] 底物溶液:0.5mL 2mg/mL TMB无水乙醇溶液,10mL底物缓冲液,32 $\mu$ L 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ 混合,现用现配;

[0015] 终止液:1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 。

[0016] 上述酶联免疫试剂盒在另一种实施方式中,所述的捕获抗体由保藏号为CGMCC No.16698的Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/5E10 1C6) 分泌得到的,Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/5E10 1C6) 作为捕获抗体检测范围:0.39ng/mL-6.25ng/mL。

[0017] 上述酶联免疫试剂盒在另一种实施方式中,所述检测抗体由保藏号为CGMCC No.16697的Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/3H3 1D2) 分泌得到。

[0018] 所述Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/5E10 1C6) 和Cry1C单抗杂交瘤细胞株 (PA1-1707016/3H3 1D2) 是用原核表达的重组蛋白Cry1C免疫BALB/c小鼠,然后用免疫后的小鼠脾细胞与商品化的小鼠杂交瘤细胞SP2/0融合,用HAT培养基筛选得到。

[0019] 本发明还提供了定量检测抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒检测抗虫蛋白Cry1C的方法,包括以下步骤:

[0020] 1) 将权利要求1所述的样品处理液、生物素标记的检测抗体、标准品、辣根过氧化物酶标记的亲合素、生物素标记的抗体稀释液、辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液、浓缩洗涤液、底物溶液、终止液置于18-25 $^{\circ}$ C,平衡至少30分钟;

[0021] 2) 分别设标准品孔、待测样本孔,在每孔中加入标准品或待测样本进行温育,然后弃去液体,甩干后加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育,弃去孔内液体,洗涤甩干后

每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液,进行温育,弃去孔内液体,洗涤甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,混匀在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长测量各孔的光密度OD值;

[0022] 3) 数据处理:将标准品及样本值减去S0孔数值后绘制曲线,如果设置复孔,则取其平均值计算,以标准品的浓度为纵坐标,OD值为横坐标,绘出标准曲线,根据样本OD值,由标准曲线查出相应的浓度。

[0023] 上述检测方法在另一种实施方式中,生物素标记的检测抗体工作液是通过将生物素标记的检测抗体液用生物素标记的抗体稀释液按1:100倍进行稀释得到的,即10 $\mu$ L生物素标记抗体加990 $\mu$ L生物素标记抗体稀释液,轻轻混匀,在临用前10分钟内配妥。辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液是通过将辣根过氧化物酶标记的亲合素用辣根过氧化物酶标记的亲合素稀释液按1:100倍进行稀释得到的,即10 $\mu$ L辣根过氧化物酶标记亲合素加990 $\mu$ L辣根过氧化物酶标记亲合素稀释液,轻轻混匀,在临用前10分钟内配妥。

[0024] 浓缩洗涤液:洗涤液低温保存会有盐析出,稀释时可在水浴中加温助溶;洗液工作液:将浓洗涤液按1:25倍用去离子水进行稀释。例如用量筒量取240mL去离子水,倒入浓烧杯或其他洁净容器中,再量取10mL浓洗涤液,均匀加入,搅拌混匀,在临用前配妥。

[0025] 上述检测方法在另一种实施方式中,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本80-120 $\mu$ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育1.5-2.5小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液80-120 $\mu$ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板2-4次,每次浸泡1-3分钟,150-250 $\mu$ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液80-120 $\mu$ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育0.5-1.5小时;弃去孔内液体,甩干,洗板4-6次,每次浸泡1-3分钟,150-250 $\mu$ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液80-100 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C避光显色15-30分钟;依序每孔加终止溶液50 $\mu$ L,终止反应。

[0026] 上述检测方法在另一种实施方式中,在步骤2)中,每孔分别加标准品或待测样本100 $\mu$ L,轻轻晃动混匀,覆上板贴,37 $^{\circ}$ C温育2小时;弃去液体,甩干,不用洗涤;每孔加生物素标记抗体工作液100 $\mu$ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板3次,每次浸泡2分钟,200 $\mu$ L/每孔,甩干;每孔加辣根过氧化物酶标记亲合素工作液100 $\mu$ L,覆上新的板贴,37 $^{\circ}$ C温育1小时;弃去孔内液体,甩干,洗板5次,每次浸泡2分钟,200 $\mu$ L/每孔,甩干;依序每孔加底物溶液90 $\mu$ L。

[0027] 本发明提供的Cry1C单抗杂交瘤细胞株(PA1-1707016/3H3 1D2)和Cry1C单抗杂交瘤细胞株(PA1-1707016/5E10 1C6)已依次于2018年11月08日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。邮编:100101,保藏编号依次为CGMCC No.16697和CGMCC No.16698。

[0028] 本发明试剂盒的特性:

[0029] 1) 灵敏度为:0.792ng/mL

[0030] 2) 精密度:批内差CV%<8%,批间差CV%<10%

[0031] 3) 特异性:本试剂盒特异性检测Cry1C,且与其他相关蛋白无交叉反应。

[0032] 有益效果:本发明一种定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry1C的酶联免疫试剂盒剂操作简便,能同时快速检测大批样品,具有高灵敏度、高特异性的特点;也是目前国内乃至国际首个能定量特异检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry1C的试剂盒。

## 附图说明

[0033] 图1是本发明的酶联免疫检测方法标准曲线图

## 具体实施方式

[0034] 下面结合附图,对本发明的具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。

[0035] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0036] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径可购得。

[0037] 实施例1定量检测转基因水稻中抗虫蛋白Cry1C

[0038] 标准品从12.5ng稀释成系列浓度标准品,按照本申请所述的检测方法在每孔中加入标准品进行温育,然后弃去液体,加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育,弃去孔内液体,甩干后每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液,进行温育,弃去孔内液体,甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值做标准曲线,详见附图1,标准曲线的 $R^2 > 0.99$ ,线性检测范围0.39g/mL-6.25ng/mL,推出样品浓度计算公式: $x = (y - 0.1088) / 0.2352$ 。

[0039] 取转基因水稻叶片,经液氮研磨,与样本提取液充分混均,冰上静置30min后取上清,适当稀释后,按照本专利所述的检测方法在每孔中加入标准品进行温育,然后弃去液体,加入生物素标记的检测抗体工作液进行温育,弃去孔内液体,甩干后每孔加入辣根过氧化物酶标记的亲合素工作液,进行温育,弃去孔内液体,甩干后每孔加入底物溶液,避光显色后每孔加入终止溶液,在反应终止后5分钟内用酶标仪在450nm波长依序测量各孔的光密度OD值,计算出转基因水稻叶片中,Cry1C的含量 $x = 1.09 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ 。

[0040] 操作要点:

[0041] 1、为保证检测结果的准确性,标准品及样本均设双孔测定。每次检测均需做标准曲线。

[0042] 2、如标本中待测物质含量过高,请先用样本稀释液进行稀释,以使样本符合试剂盒的检测范围,最后计算时再乘以相应的稀释倍数。

[0043] 3、加样:加样时使用一次性的洁净吸头,避免交叉污染。加样时尽量轻缓,避免起泡,将样本加于酶标板孔底部,切勿沿孔壁加样。一次加样时间最好控制在10分钟内,如标本数量多,使用排枪加样。

[0044] 4、温育:为防止样本蒸发或污染,温育过程中酶标板必须覆上板贴,实验过程中酶标板应避免处于干燥的状态。温育过程中随时观察温箱温度是否恒定于37℃,及时调整。温育过程中,温箱不易开启太多次,以免影响温度平衡。

[0045] 5、洗涤:洗涤过程非常重要,不充分的洗涤易造成假阳性。

[0046] (1) 手工洗板方法:吸去(不可触及孔壁和孔底)或甩掉酶标板内的液体;在实验台上铺垫几层吸水纸,酶标板朝下用力拍几次;将推荐的洗涤缓冲液按200 $\mu\text{L}$ /孔注入孔内,浸泡2分钟。根据操作步骤中所述,重复此过程数次。

[0047] (2) 自动洗板:如果有自动洗板机,应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

[0048] 6、显色:为保证实验结果的准确性,底物反应时间到后应尽快加入终止液。可在加入底物溶液后每隔一段时间观察一下显色情况以控制反应时间(比如每隔10分钟)。当肉眼

可见标准品前3-4孔有明显梯度蓝色,后3-4孔显色不明显时,即可加入终止液终止反应,此时蓝色立刻变为黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物溶液的加入顺序相同。

[0049] 7、底物溶液应为浅蓝色或无色,如果颜色严重变深则必须弃用。底物溶液易受污染,请避光妥善保存。

[0050] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

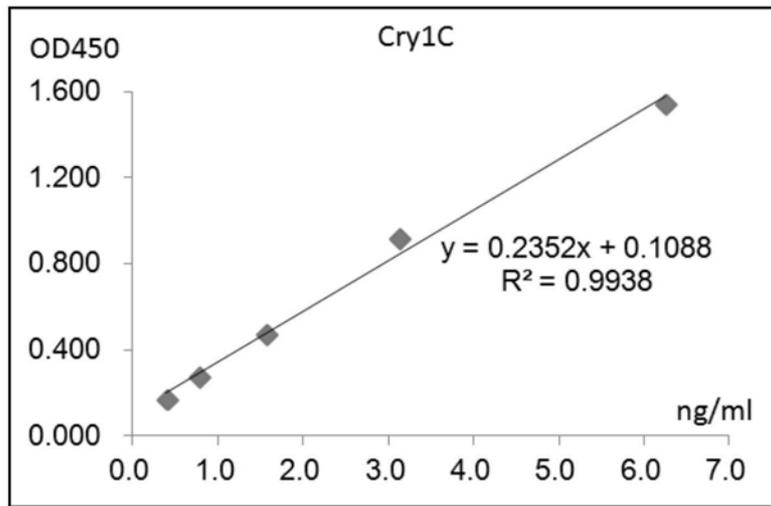


图1