

文章编号 :1009 - 038X(2003)01 - 0049 - 04

应用间接 ELISA 方法定量检测转基因抗虫玉米

刘光明^{1,2}, 苏文金^{1,3}

(1. 厦门大学 生命科学学院 福建 厦门 361005 ; 2. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门 361005 ;
3. 集美大学 生物工程学院 福建 厦门 361005)

摘要 :应用纯化的 Bt1 杀虫晶体蛋白质作为标准蛋白和免疫抗原,通过抗体-抗原-酶标抗体反应,建立了间接酶联免疫吸附测定法(ELISA),以快速检测转基因抗虫玉米中的 Bt1 表达蛋白.用建立的 ELISA 法对 4 种进口玉米实物样品进行了测定,实验结果得到了免疫印迹分析的验证,并与进口试剂盒方法的定量分析结果相一致.

关键词 :转基因玉米 ; 杀虫蛋白 ; ELISA 检测

中图分类号 :Q 503

文献标识码 :A

Quantitative Detection of Genetically Modified Insecticidal Maize by ELISA

LIU Guang-ming^{1,2}, SU Wen-jin^{1,3}

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China ; 2. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361005, China ; 3. School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361005, China)

Abstract :Based on the reaction among antibody-antigen-enzyme antibody, using purified Bt1 insecticide crystal protein as standard protein and immunity antigen, a quantitative indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was established to detect Bt1 protein expressed in genetically modified maize. 4 import maize samples were detected by the ELISA, compared to western-blotting & KIT assay methods. and results were agreeable.

Key words :genetically modified maize ; Bt1 protein ; ELISA detection

2001 年全世界转基因作物种植面积高达 5 260 万 hm^2 , 其中种植面积居第二位的转基因玉米为 980 万 hm^2 ^[1]. 随着转基因作物的商品化发展, 转基因农作物的安全性问题, 即它对环境保护、生态平衡存在潜在的危害, 以及由它加工而成的转基因食品中含有新的遗传物质和蛋白质而引起的食用安全性受到越来越广泛地关注. 目前世界上大多数国家如欧盟、俄罗斯、日本、韩国、澳大利亚、新西兰等国主张对转基因产品加贴限量标签, 即规定转基因

产品的颗粒比超过一定阈值(如 1%, 即 100 粒中有 1 粒为转基因玉米)则需有强制性标识. 我国于 2001 年 5 月 23 日颁布了《农业转基因生物安全管理条例》, 强调了对转基因生物及其产品的管理与控制.

不论是对转基因食品进行标注管理, 或是对转基因与非转基因原料的分别输送, 转基因原料和食品的分析检测技术是必不可少的, 其中定量检测技术更具有现实意义和应用前景, 这是对转基因产品

收稿日期 2002 - 07 - 04 ; 修回日期 2002 - 10 - 14.

基金项目 厦门市科技计划资助项目(3502Z2001109).

作者简介 刘光明(1972 -), 男, 湖南株洲人, 分子生态学博士研究生, 工程师.

进行安全性评价和实施监管的基础。目前转基因产品的检测主要有 PCR(聚合酶链式反应)和 ELISA(酶联免疫吸附测定)等方法^[2]。PCR 检测法是将样品中提取的 DNA 作为模板,使微量、特定的目标 DNA 片段在几个小时内迅速扩增百万倍,因而具有灵敏和快速的优点;ELISA 检测法是一种利用免疫学原理检测抗原或抗体的技术,在生物医学等领域已得到了广泛应用,ELISA 方法检测外源基因表达蛋白的灵敏度高于 0.1%^[3],并且具有可定量分析、可同时检测多个样品和操作简单的优点,因此 ELISA 方法成为转基因产品的检测研究中不可缺少的方法。

作者以商品化转基因玉米中最常用的 Bt1 杀虫蛋白作为标准蛋白和免疫抗原,通过抗体-抗原-酶标抗体反应,建立了间接 ELISA 方法,以快速、定量检测转基因玉米中的 Bt1 表达蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 由厦门口岸入境的来自美国、加拿大等国的进口玉米随机抽取的样品;Bt1 玉米标准样品 购自美国 SDI 公司;Bt1 晶体蛋白:北京大学生命科学学院许崇仁教授提供;新西兰大白兔 购自厦门市药品检验所。

1.1.2 主要仪器与试剂 BIO-RAD Model-450 型酶标仪;Sigma 2K15 离心机;CARY 3E 紫外分光光度计;国产电动粉碎机;Bt 玉米检测试剂盒购自美国 SDI 公司;PVDF 膜购自 Promega 公司;邻苯二胺、BSA 等其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 Bt1 晶体蛋白碱溶解液的制备 称取 Bt1 晶体蛋白质 10 mg 加入 5 mL 0.2 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.5)悬浮 30 min,1 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,沉淀用 3 mL PBS 同样悬浮、离心、吸取上清液,沉淀用 2 mL PBS 同样悬浮、离心、吸取上清液;将 3 次上清液混合后于 5 000 r/min 离心 30 min,弃上清液,沉淀用 3 mL 0.1 mol/L NaOH 溶解 1.5 h,其间多次搅拌;5 000 r/min 离心 20 min,吸取上层液用 pH 2.0 的盐酸调 pH 至 7.0,用生理盐水定容至 5 mL 即为 Bt1 晶体蛋白碱溶解液,质量浓度测定采用紫外分光光度法^[4]。

1.2.2 Bt1 抗体的制备 将 1 mL Bt1 晶体蛋白质碱溶解液(约 0.2 mg)与等量福氏完全佐剂混合、乳化,多点皮下注射免疫大白兔,然后用福氏不完全佐剂代替完全佐剂,分别于 7 d、14 d 和 30 d 时强化

免疫;用琼脂糖双扩散法测定效价达 1:100 以上时,采血获免疫 Bt1 蛋白质血清,并用硫酸铵盐析法纯化抗体^[5]。

1.2.3 Bt1 抗体的免疫印迹分析 参照《分子克隆实验指南》^[5],应用制备的 Bt1 抗体对 Bt1 玉米标准颗粒比 0.15% 和玉米 1 号样品进行免疫印迹分析。

1.2.4 间接 ELISA 检测 Bt1 蛋白方法的建立

1) 试剂的配制:KH₂PO₄ 0.02 g,NaCl 0.8 g,KCl 0.02 g,Na₂HPO₄ 0.14 g,BSA 0.5 g,Tween-20 0.5 mL,蒸馏水定容至 100 mL 即为 PBST 缓冲液;Na₂CO₃ 1.33 g,NaCl 1.46 g,VC 0.5 g,加入 250 mL 蒸馏水即为样品提取液;BSA 0.3 g 溶于 10 mL PBST 缓冲液即为封闭剂;NaCl 4.0 g,KH₂PO₄ 0.1 g,Na₂HPO₄·12H₂O 1.48 g,Tween-20 0.5 mL,加入蒸馏水 500 mL 即为洗涤液;NaCl 4.0 g,KH₂PO₄ 0.1 g,Na₂HPO₄·12H₂O 1.48 g,白明胶 0.5 g,Tween-20 0.5 mL,加入蒸馏水 500 mL 即为抗体稀释液;C₆H₈O₇ 2.55 g,Na₂HPO₄·12H₂O 9.215 g,Tween-20 0.5 mL,加入蒸馏水 500 mL 即为底物缓冲液;邻苯二胺 0.01 g,底物缓冲液 4 mL,加入 2 μL 体积分数为 30% 的 H₂O₂ 即为底物溶液(现配现用);2 mol/L H₂SO₄ 为终止液。

2) Bt1 蛋白质标准溶液的配制:将 Bt1 晶体蛋白质碱溶解液用 PBST 缓冲液稀释成质量浓度为 10 μg/mL,然后依次 2 倍稀释成 10 个质量浓度梯度(包括 0 μg/mL)。

3) 待测样品蛋白质的提取:取足量的样品(>667粒)用粉碎机磨碎成粉状后,从中称取 1.0 g 于 10 mL 试管中,加入 5 mL 样品提取液,充分摇匀后于 4 ℃放置 4 h,5 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液。

4) ELISA 测定:在酶标板孔中加入 Bt1 蛋白标准和待测样品(100 μL/孔),每个样品重复 3 次;将酶标板放入湿盒中,37 ℃包被 3 h,加入封闭剂(100 μL/孔),37 ℃温育 30 min;取出甩干,加入洗涤液(150 μL/孔),放置 1 min,甩掉洗涤液并吸干,重复洗涤 4 次;加入用抗体稀释液 1:500 稀释的抗体(100 μL/孔),湿盒中 37 ℃温育 30 min;洗板上;加入用抗体稀释液 1:1 000 稀释的酶标二抗(100 μL/孔),湿盒中 37 ℃温育 30 min;洗板上;加入现配的底物溶液(100 μL/孔),湿盒中 37 ℃温育 15 min,加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应(50 μL/孔);酶标仪测定样品的 OD₄₉₂ 值。

1.2.5 试剂盒法(双抗体夹心 ELISA)检测 Bt1 蛋白 称取 0.2 g 粉状样品于 1.5 mL 管中,加入 1

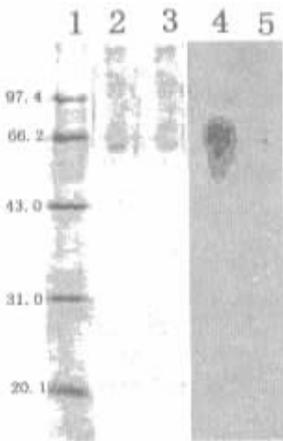
mL 提取液,充分振摇 5 min,室温静置 30 min,5 000 r/min 离心 5 min,吸取上清即为样品蛋白;向酶联板孔中加入结合液(100 μL/孔),再分别加入颗粒比 0%、0.15%、0.5%、2.0% 的 Bt1 玉米标准样品和待测样品(100 μL/孔),每个样品重复 3 次,覆盖封口膜,混匀,室温放置 1 h;加入洗涤液(300 μL/孔)重复洗涤 5 次;加入显色液(100 μL/孔),混匀,室温放置 10 min;加入终止液(100 μL/孔),酶联仪测定样品的 OD₄₅₀ 值。

1.2.6 应用间接 ELISA 方法对实物进行定量检测分析 应用建立的 ELISA 方法对 4 份实物样品进行检测,并设立无菌双蒸水(空白)、非转基因样品(阴性)和 Bt1 玉米标准样品(阳性)3 份对照。

2 结果与分析

2.1 Bt1 抗体的免疫印迹分析

将 Bt1 玉米阳性标准样品(颗粒比 0.15%)和玉米实物样品 M-J1 的蛋白溶液进行 SDS-PAGE 电泳后,转移到 PVDF 膜上,用质量浓度 5 g/dL 脱脂奶粉封闭非特异性位点,然后分别用一抗(兔抗 Bt1 抗体,1:200)及二抗(酶标羊抗兔,1:1 000)进行反应,底物 DAB-H₂O₂ 显色。结果显示(见图 1),标准样品和实物样品均在相对分子质量 62 000 处出现显色条带,表明制备的 Bt1 抗体能特异性识别 Bt1 蛋白。



1. Mark 2. 标准蛋白电泳;3. M-J1 电泳;4. 标准蛋白免疫印迹;5. M-J1 免疫印迹

图 1 Bt1 抗体的免疫印迹分析结果

Fig.1 Western-blotting analysis of Bt1 protein

2.2 间接 ELISA 法和试剂盒法检测标准样品 Bt1 蛋白

Bt1 玉米检测试剂盒中 4 个标准样品的颗粒比分别是 2%、0.5%、0.15%、0%,试剂盒法使用二种抗体同时结合一个 Bt1 蛋白分子,形成双抗体夹心式 ELISA 用于检测杀虫蛋白。间接 ELISA 与双抗

体夹心 ELISA 的根本差别在于前者直接包被抗原,后者是先包被特异性抗体。从间接法和试剂盒法分别检测标准样品的结果中可以看出,虽然间接法的阴性本底高于试剂盒法,其阳性标准样品的检测值低于试剂盒法,但二者之间没有显著差异(见图 2)。结果还显示,间接法对 Bt1 蛋白的最低可检值为 0.15%(即 667 粒中有 1 粒为转基因玉米),随着标准样品的颗粒比由低至高成倍增长,其相应的 OD₄₉₂ 值(3 个检测结果平均值)也呈梯度上升。以标准样品 Bt1 蛋白质颗粒比为横坐标,以相应的 OD₄₉₂ 值为纵坐标,得到间接法检测 Bt1 蛋白质的颗粒比标准曲线(图 3)结果表明标准样品 Bt1 蛋白质颗粒比与相应的 OD₄₉₂ 值之间有良好的线性关系。

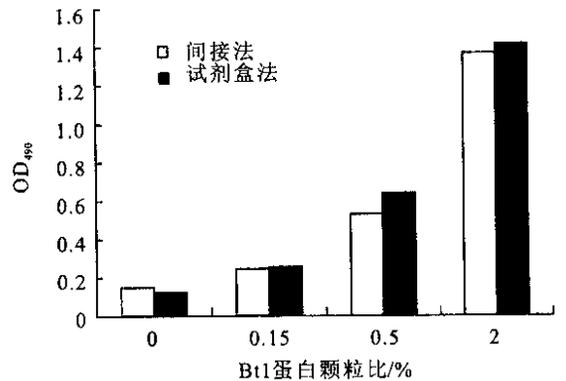


图 2 间接 ELISA 法和试剂盒法检测标准样品 Bt1 蛋白的结果

Fig.2 The results of Bt1 protein detection of standard samples by indirect ELISA & commercial kit

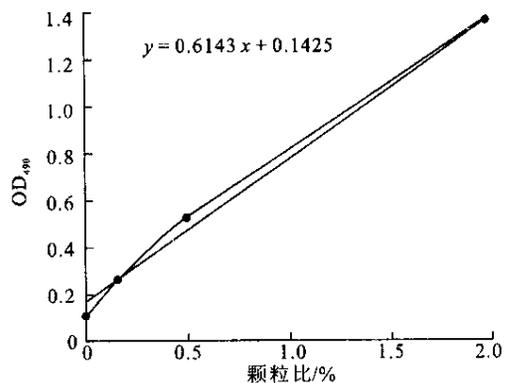


图 3 间接 ELISA 检测 Bt1 蛋白的颗粒比标准曲线

Fig.3 Standard curve for detection of Bt1 protein by ELISA

2.3 间接 ELISA 法和试剂盒法检测 Bt1 晶体蛋白

酶标仪测定的质量浓度梯度 Bt1 蛋白标准溶液的 ELISA 结果显示,Bt1 蛋白质的间接法最低可检值为 0.312 μg/mL,试剂盒法最低可检值为 0.625 μg/mL。随着标准品的质量浓度由高至低成倍稀释,间接法检测的 OD₄₉₂ 值也呈梯度递减。以标准溶液

Bt1 蛋白质质量浓度为横坐标,以相应的 OD₄₉₂值(3 个检测结果平均值)为纵坐标,得到间接 ELISA 检测 Bt1 蛋白质的质量浓度标准曲线(图 4)。结果表明,标准溶液 Bt1 蛋白质质量浓度与相应的 OD 值之间也有着良好的线性关系。

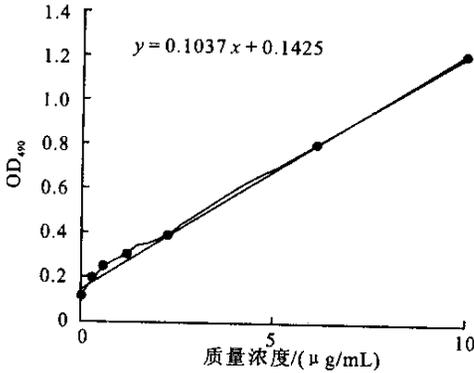


图 4 间接 ELISA 法检测 Bt1 蛋白质质量浓度标准曲线

Fig.4 Standard curve for detection of Bt1 protein concentration by ELISA

2.4 建立的间接 ELISA 方法定量检测玉米实物样品

根据间接 ELISA 法检测 Bt1 蛋白的颗粒比标准曲线(图 3)与质量浓度标准曲线(图 4),以及间接法测定的玉米实物样品结果(图 5),可以换算得到样品颗粒比结果与质量浓度结果。样品 M-J1 的检测值最大,因而其蛋白质质量浓度(10.786 μg/mL)和颗粒比(0.849%)在 4 个检测样品中也是最高的。样品 M-J3(5.040 μg/mL 和颗粒比 0.645%),M-J4(1.750 μg/mL 和颗粒比 0.259%)的检测值也都大于 Bt1 蛋白的 ELISA 最低可检值,因而可判定样品 M-J1, M-J3, M-J4 为检测结果阳性。样品 M-J2 的检测值(0.276 μg/mL 和颗粒比 0.016%)低于 Bt1 蛋白的 ELISA 最低可检值,因而可判定为检测结果阴性。本实验在应用 ELISA 法检测实物样品时,同时做了阴性(NC, 颗粒比 0%)、阳性(PC, 颗粒比 0.15%)和空白(BC, 提取液)3 个对照,并与试剂盒法做了对比实验,对照以及对比实验结果一致,显示应用本方法检测玉米实物的结果是可靠的。

3 讨论

转基因产品的检测方法如分子杂交、PCR 扩增和生物学测定等存在操作复杂、成本高及难以标准化的不足^[1]。利用 ELISA 法检测玉米样品中 Bt1 蛋白质具有快速、简单、低耗、结果客观、易判定等优点。

参考文献:

- [1] Anklam E, Gadani F, Heinze P, et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural products and plant-derived food products[J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 214: 3-26.

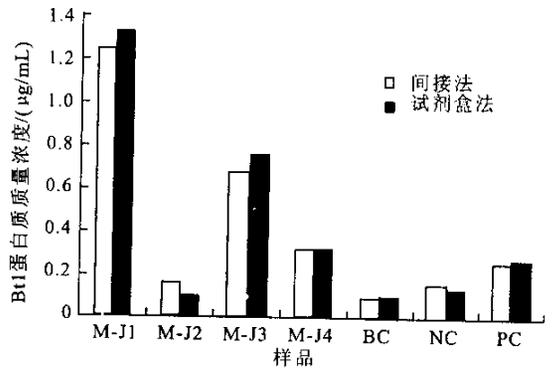


图 5 间接 ELISA 法和试剂盒法检测实物样品 Bt1 蛋白质的结果

Fig.5 The results of Bt1 protein detection of practical samples by indirect ELISA & commercial kit

点,更为重要的是可对转基因产品的含量进行定量分析。目前世界各国相继出台了转基因产品的限量标签制(即转基因品种在同一物种的颗粒比超过一定阈值则需加注标签),如欧盟规定的阈值颗粒比为 1%,日本规定的阈值颗粒比为 5%和韩国规定的阈值颗粒比为 3%等,因而建立 ELISA 方法定量检测转基因产品具有现实意义和实用价值。

ELISA 检测灵敏快速,但容易出现非特异性吸附及本底过高的问题^[3]。为此,实验采取了下列措施以增加方法的可行性和可靠性:(1)加入牛血清蛋白以封闭板孔上非特异结合位点;(2)加入适量的表面活性剂(Tween-20)以去除过量的物质;(3)洗涤液浸泡时间延长至 5 min;(4)在应用本方法定量分析实物样品时,在微孔板上设立了多个阳性、阴性标准样品和空白对照,并作了 3 个平行检测,这样既便于制作每次实验的定量标准曲线,也有利于提高检测结果的准确性。实验以 Bt1 晶体蛋白质碱溶液为抗原制备了相应的抗体,建立了检测玉米 Bt1 蛋白的间接 ELISA 定量检测方法,并测定出该方法对 Bt1 蛋白质的质量浓度最低可检值为 0.312 μg/mL 和颗粒比最低可检值为 0.15%。

免疫印迹分析试验、进口试剂盒方法的验证结果与实物样品的检测结果表明,建立间接 ELISA 法可以成功的检测转基因抗虫玉米中 Bt1 蛋白,检测敏感度高于试剂盒法,且具有灵敏简便、快速准确、成本低的优点。因此为转基因抗虫玉米中 Bt1 蛋白质的定性和定量检测提供了有效的手段,在进出口产品的检验检疫工作中有着较好的应用前景。

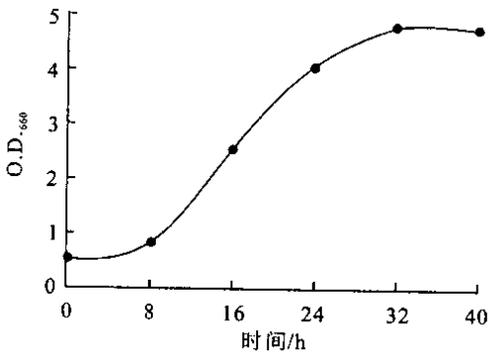


图1 摇瓶发酵中菌浓吸光度变化曲线

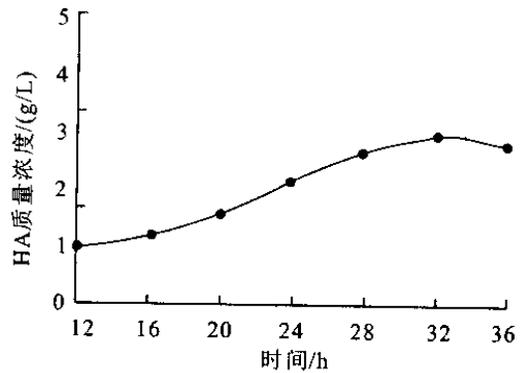
Fig. 1 Time course of OD₆₆₀ in the shaking-flask fermentation

图2 摇瓶发酵中菌浓 HA 变化曲线

Fig. 2 Time course of HA concentration in the shaking-flask fermentation

参考资料：

- [1] Meyer K, Palmer J W. The polysaccharide of the vitreous humor[J]. *Biochem*, 1934, 107: 629-634.
- [2] 郭学平, 凌沛学, 王春喜, 等. 透明质酸的生产[J]. *药物生物技术*, 2000, 7: 61-64.
- [3] Laurent TC. Biochemistry of hyaluronan[J]. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 1987 (suppl), 442: 7-24.
- [4] Sugahara K, Schwartz NB, Dorfman A. Biosynthesis of hyaluronic acid by streptococcus[J]. *Biochem*, 1979, 254: 6252-6261.
- [5] 甘肃农业大学. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1989. 156-177.
- [6] 甘肃农业大学. 兽医微生物学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 1980. 79-82.
- [7] Johns MR, Goh L-T, Oeggerli A. Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid produced by streptococcus zooepidemicus[J]. *Biotech*, 1994, 15(5): 507-512.
- [8] 沈渤江, 张天民. 人脐带眼科用透明质酸的制备和分析检验[J]. *山东医学院学报*, 1985, 23: 15-20.
- [9] 张铁茂. 试验设计与数据处理[M]. 北京: 兵器工业出版社, 1990.

(责任编辑: 李春丽)

(上接第52页)

- [2] 刘光明, 苏文金. 转基因产品的检测方法[J]. *集美大学学报(自然科学版)*, 2001, 6(1): 87-92.
- [3] Dierk E R, Eva M W, Shin Y K, et al. Identification of unacceptable background caused by non-specific protein adsorption to the plates using a standardized ELISA[J]. *Enzyme-linked Methods*, 1999, 226: 85-91.
- [4] 沈法富, 于元杰, 尹承侑. 利用 Dot-ELISA 检测 Bt 棉杀虫蛋白的研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(1): 15-19.
- [5] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1995.

(责任编辑: 杨萌)