

抗体夹心BGT-ELISA方法的建立 及在转基因白桦中的应用

曾凡锁, 骆薇, 赵宏翠, 詹亚光, 孙东

(东北林业大学生命科学学院林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

摘要:以蜘蛛杀虫肽与Bt-toxin C肽融合蛋白基因(*bgt*基因)的表达产物的定量分析为研究目标,采用原核表达及纯化出融合蛋白His-BGT作为抗原进行免疫,得到相应的抗血清,采用ELISA法检测效价在1:10 000以上,并对抗血清进行了免疫亲和层析,获得了高纯度的IgG,Western blot检测具有较好的特异性。采用过碘酸钠法将抗体标记辣根过氧化物酶(HRP),得到第二抗体即酶标抗体,标记率在85%以上。建立起检测BGT杀虫蛋白的快速、灵敏的方法。应用该检测方法,分析了不同转基因白桦(*Betula platyphylla* Suk.)株系中BGT蛋白含量占叶片可溶性总蛋白含量的0.05%~0.3%,并利用Western blot验证了此方法是可靠的。说明抗体夹心BGT-ELISA方法能够定量分析转基因植株中BGT蛋白的含量,为转*bgt*基因植物的检测和应用奠定了基础。

关键词:转基因白桦;多克隆抗体;酶标抗体;酶联免疫

中图分类号:S718.3 **文献标识码:**A **论文编号:**2009-1497

Construction and Application of BGT-ELISA on Transgenic Birch

Zeng Fansuo, Luo Wei, Zhao Hongcui, Zhan Yaguang, Sun Dong

(Key Laboratory of Forest Tree Improvement and Biotechnology of Ministry of Education,
College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040)

Abstract: This paper took expressed product of BGT gene consisting of the insecticidal toxin gene from the spider, *Atrax robustus*, and the C terminal of Cry IA (b) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic birch as research target. Through IPTG induction and metal chelate affinity chromatography purification, fusion protein His-BGT with high purity and its specific antibody have been obtained. The fusion protein as antigen was used to immunize rabbit for the preparation of polyclonal antibodies with high titer. The titer of serum antibody was above 1:10 000 as detected by ELISA and purified by immuno-affinity chromatography. The high purity of IgG was obtained. Western blot assay demonstrated that the IgG fusion protein after purification showed definite specificity. With the method of NaIO₄ anti-BGT antibody was labeled with HRP to make enzyme-labeled antibody. The labeling rate was above 85%. An ELISA bi-antibody sandwich for the detection of BGT protein in transgenic birch has been established. The method has been preliminary optimized. A rapid and sensitive method for detecting BGT insecticidal protein was preliminary established. The BGT expression level of 5 month in the plants of BGT transgenic birch ranged from 0.05% to 0.3% of total soluble protein by established detection method. And this method was reliable that was validated by western blot.

Key words: Transgenic birch (*Betula platyphylla* Suk.), polyclonal antibody, HRP, ELISA

基金项目:国家自然科学基金项目(30872045);教育部博士点新教师基金(200802251038)。

第一作者简介:曾凡锁,男,1980年出生,东北林业大学生命科学学院讲师,博士,主要从事植物基因工程方面的研究。通信地址:150040 黑龙江哈尔滨市和兴路26号 东北林业大学生命科学院, E-mail: youpractise@126.com。

通讯作者:詹亚光,女,1963年出生,东北林业大学生命科学学院教授,博士生导师,主要从事植物生物技术方面的研究。Tel: 0451-82191752, E-mail: yaguangzhan@126.com。

收稿日期:2009-07-22, **修回日期:**2009-09-11。

0 引言

蜘蛛杀虫肽和Bt-Toxin C肽融合蛋白(Spider Insecticidal Peptide and Bt-toxin C Peptide Gene, BGT)基因是具有2种不同杀虫机制的抗虫基因^[1-2]。迄今,人们相继采用农杆菌介导法将此融合基因导入棉花、白桦、小黑杨、欧美杨108号等植物中,并已获得抗虫的转基因植株^[3-6]。笔者构建了表达载体pET28a-BGT,并用于表达融合蛋白His-BGT^[7]。经IPTG的诱导,表达出了融合蛋白His-BGT,该蛋白的大小与预测结果一致。采用金属亲和层析法对融合蛋白His-BGT进行了纯化,获得了纯度90%以上的融合蛋白。笔者以融合蛋白His-BGT为抗原,对兔进行免疫实验,制备抗融合蛋白His-BGT的多克隆抗体。通过Western杂交实验,进一步确认获得的纯化IgG对融合蛋白能否具有良好的结合特异性和免疫源性。采用过碘酸钠法,用辣根过氧化物酶(HRP)标记多克隆抗体,并通过ELISA检测纯化的酶标抗体的免疫性及特异性。

1 材料与方法

1.1 BGT多克隆抗体的制备

兔抗BGT多克隆抗体的制备按照文献[8]的方法。

1.2 多克隆抗体的纯化

1.2.1 抗血清处理及抗体亲和纯化 将收集的抗血清以10000 r/min, 4℃离心20 min,收集上清,上清用一次性0.22 μm滤器过滤除菌,在抗血清中加入等体积的平衡缓冲液(0.1 mol/L磷酸缓冲液, pH 7.4, 含0.15 mol/L NaCl)。抗体亲和纯化具体过程参考文献[9-10]的方法。

1.2.2 抗体浓度的测定 将抗体用PBS缓冲液稀释20倍后,在280 nm处测吸光度值,以PBS为空白对照。抗体浓度(mg/ml)=(A₀-A₁)/1.35×20; A₀: 抗体蛋白在280 nm的吸光度值; A₁: 空白对照的吸光度值。

1.3 Western blot验证兔抗BGT多克隆抗体的特异性

取蛋白样品与2×上样缓冲液等量混合后,将纯化的BGT蛋白和空白样品按预定顺序加样,每孔20 μl。电泳及Western blot杂交参考文献[11]的方法。

1.4 辣根过氧化物酶(HRP)标记多克隆抗体的制备和纯化

辣根过氧化物酶(HRP)标记抗BGT多克隆抗体采用过碘酸钠法。具体过程参考文献[11]的方法。

1.5 克分子比值及标记率的测定

紫外分光光度计测定酶结合物的OD_{403nm}和

OD_{280nm}根据以下公式计算:酶量(mg/ml)= OD_{403nm}×0.4; 抗体量(mg/ml)=(OD_{280nm}-OD_{403nm}×0.3)×0.62; 克分子比值(E/P)=酶量×4/抗体量; 标记率=OD_{403nm}/OD_{280nm}。

1.6 直接ELISA法检测HRP标记抗体及酶标抗体的保存

参考文献[12]的方法采用直接ELISA法检测HRP标记抗体的特异性。纯化后的酶标抗体加入等量甘油后,小量分装,-20℃存放,防止反复冻融;或加入等量60%甘油4℃保存;不宜加NaN₃或酚防腐,否则会影响酶活性。必要时冻干保存,以BSA或脱脂牛奶作保护剂。

1.7 抗体夹心ELISA法程序的建立

1.7.1 ELISA基本程序方法

包被:将制备的抗体溶液用包被缓冲液稀释至适当浓度,每孔加100 μl,4℃包被过夜。洗涤缓冲液洗板3次,每次3 min。

封闭:每孔加1% BSA 200 μl,37℃封闭2 h。洗板3次,每次3 min。

加样品:封闭完毕后,以纯化获得的融合蛋白BGT为标准品,做浓度梯度取0.5、1、2、4、6、8、10 ml(75 mg/ml)稀释至1 ml,同时以BSA为阴性对照,每个浓度重复2次,100 μl/孔,37℃孵育1 h。

加酶标抗体:反应完毕后,洗板4次,每次3 min。将酶标抗体用抗体稀释液按一定比例进行稀释,100 μl/孔。

加底物:酶标抗体倒掉,洗板5次,每次5 min,再蒸馏水洗3次,每次1 min左右,加TMB底物100 μl/孔,37℃反应直到显色约10~15 min;在酶标仪上450 nm波长读数。

1.7.2 酶标抗体工作浓度的确定 采用直接ELISA法,以纯化获得的融合蛋白BGT为标准品,做浓度梯度0.5、1、2、4、6、8、10 ml(75 mg/ml)稀释至1 ml,同时将酶标抗体分别做1:100、1:400、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000,6个梯度稀释进行ELISA实验,测其OD值。

1.7.3 IgG包被浓度的确定 采用棋盘方阵滴定法,按1、2、5、8 mg/ml的浓度包被IgG,采用酶标抗体初步选定的工作浓度,按照抗体夹心ELISA的基本程序,以5 mg/ml BGT为标准蛋白及PBS作为阴性对照进行测定,测其OD值,并比较P/N值,确定最佳的包被浓度和最适的酶标抗体的工作浓度。

1.7.4 酶标反应板均一性检测 随机抽取5条反应板,编为A、B、C、D、E,按照优化的抗体夹心ELISA

法测定,每个浓度重复2次,测定OD值,计算板间变异系数。

1.8 转基因白桦中BGT含量的检测

1.8.1 转基因白桦材料 采用农杆菌介导法获得的转抗虫基因白桦(*Betula platyphylla* Suk)。工程菌为根癌农杆菌 LBA4404 (*Agrobacterium tumefaciens*),携带双元载体系统,其中质粒 pYHY,长 13.9 kb,携带抗虫基因(蜘蛛杀虫肽基因与 *Bt* 基因 C 肽的嵌合基因,简称 *bgt* 基因)、*npt* II 基因和 *gus* 基因。转抗虫基因白桦栽植于东北林业大学白桦强化育种基地内,常规管理,2008 年春季取植株上部叶片。

1.8.2 转基因白桦总蛋白的提取及定量 白桦是一种叶片含有多糖和多酚类的木本植物,对蛋白的提取有很大的影响。笔者在提取缓冲液中加入水不溶性 PVPP,可以很好的除去大多数色素,L-抗坏血酸有

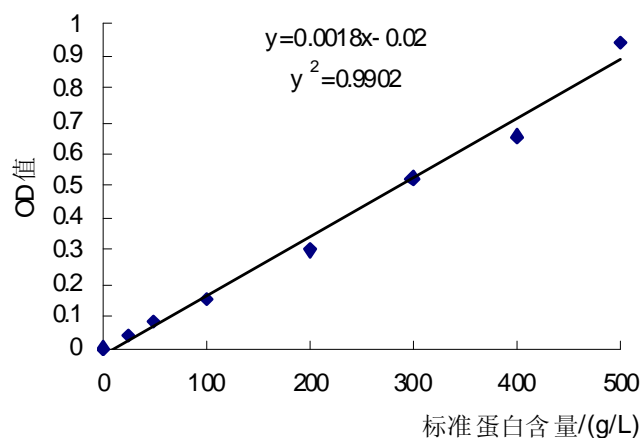


图1 蛋白含量标准曲线

利于 ELISA 检测背景值的降低。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天),对提取的样品进行定量分析,具体操作见试剂盒说明书。以 BSA 为标准蛋白,制作蛋白含量标准曲线,结果如图 1。根据标准曲线计算所提取的样品的蛋白含量。

1.8.3 标准曲线的制作 按以上优化的实验最佳条件,取 BGT 蛋白梯度 3.75、7.5、15、30、45、60、75 ng/孔,浓度分别是 37.5、75、150、300、450、600、750 ng/ml 的 BGT 标准液及阴性对照,每个浓度设两个平行孔,按抗体夹心 ELISA 操作程序,测定 OD₄₅₀ 值,对测定数据进行回归分析,得出回归方程,绘制标准曲线见图 2,回归方程为 $y=0.0015x-0.0694$ 。

1.8.4 转基因白桦中 BGT 蛋白表达量的测定 按照建立的抗体夹心 ELISA 法进行,在加样时,将蛋白提取液及非转基因样品用 PBS 缓冲液稀释至 10 倍进行测定,每个样品重复 3 次。将测定结果带入回归方程计算出相应 BGT 的含量。根据样品中 BGT 的量和

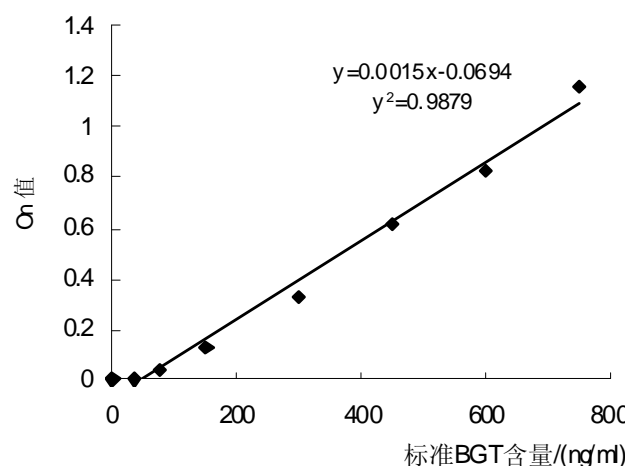


图2 抗体夹心 ELISA 标准曲线

可溶性总蛋白的含量计算 BGT 蛋白占可溶性总蛋白的相对比例。

2 结果与讨论

2.1 抗血清的制备

两只家兔经基础免疫和两次加强,免后耳缘静脉采血,间接 ELISA 测定其效价,检测结果见表 1,颈动脉采血共获得全血 1 号兔 23 ml,2 号兔 35 ml。从表中的数据可知,2 号兔的抗血清效佳好于 1 号兔,获得很好的免疫效果,抗血清的效价可以达到 1:10 000 以上。故取 2 号兔的血清进行纯化。

表1 间接ELISA测定兔血清效价

血清稀释度	1号兔	2号兔
1:1 000	1.398	2.246
1:5 000	1.474	1.901
1:25 000	1.385	1.595
1:125 000	0.704	0.869
1:625 000	0.189	0.323
1:3 125 000	0.066	0.097

多克隆抗血清的特异性和效价取决于抗原和动物两方面因素。笔者制备的多克隆抗体需要具备足够的特异性和亲和力,因此对抗原的要求比较高。首先是抗原要具备足够的纯度,试验所使用的免疫及检测抗原均为此次实验室纯化获得,经检测其纯度在 90% 以上,这样就减少了无关抗体的产生。其次是免疫剂量的选择,由于 BGT 蛋白与兔的种属间的差异较大,所以采用每只新西兰大白兔一次 300 μg 的剂量进行免疫,效价可达到 1:10 000 以上。

动物的选择常根据抗体的用途和用量来决定,也与抗原的性质有关。并且由于对免疫应答的个别差异,免疫时应同时选用数只动物进行免疫。实验

中1号兔的免疫效果较2号兔差,可能是由于实验动物个体间对某一种抗原的免疫应答的差异所造成。

2.2 抗体的纯化

Sepharose Protein G的凝胶柱中的Protein G可以特异性的吸附血清中的IgG抗体,采用0.5 ml/min的加样流速可以使血清中的IgG抗体充分和Protein G结合。当采用pH 7.4的Binding Buffer冲洗柱子时,由于IgG与Protein G的特异性结合被留在凝胶柱上,而未被Protein G结合的IgA, IgM会被冲洗下来;当降低缓冲液的pH即改用2.7的Elution Buffer时,被Protein G吸附的IgG其结合力减弱而被洗脱下来,因此可以得到较高纯度的IgG抗体。IgG的洗脱曲线见图3。

免疫血清的成分非常复杂,除特异性抗体外尚存在多种无关蛋白,会干扰免疫反应,必须根据试验要求对抗体进行适当的纯化。常用的纯化方法有低温

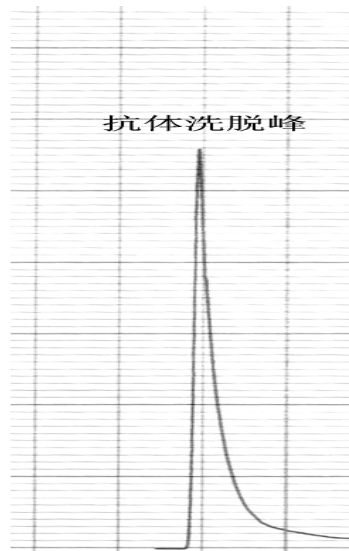


图3 IgG的洗脱曲线

乙醇沉淀法、中性盐沉淀法、凝胶柱层析法、纤维素离子交换柱层析、免疫亲和层析、高效液相色谱法等。试验中的多抗同样要求有比较高的特异性和亲和力,因此,采用Sepharose Protein G亲和层析纯化多克隆抗体,可以获得较高纯度的IgG用于后续实验。

将纯化的IgG进行12%的SDS-PAGE电泳,结果见图4,从图中可知,一个条带的大小为23 KDa左右,另一条在53 KDa左右,与IgG中的重链与轻链的分子质量相同,说明所纯化的抗体为IgG,抗体纯化的方法是可行的。

2.3 Western blot检测抗体的特异性

将纯化的BGT蛋白,进行western杂交,纯化的多克隆抗体作为一抗,碱性磷酸酶标记的羊抗兔IgG

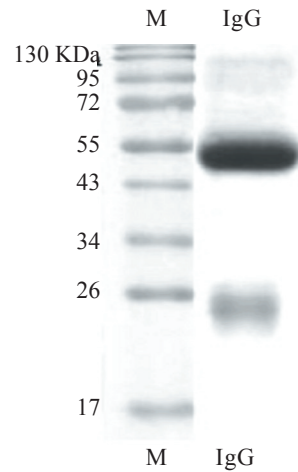


图4 纯化IgG的SDS-PAGE电泳图

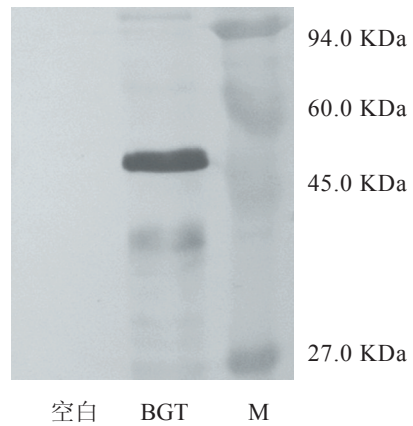


图5 Western blot检测结果

作为二抗。结果如图5,在51 KD左右得到一条清晰的条带,而空白对照则没有相应的条带,证实了抗体能够有效的识别BGT蛋白,且具有较好的特异性。

2.4 酶标抗体的制备与纯化

2.4.1 酶标抗体的制备 目前在免疫酶技术中常用的酶为辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶(AP),其次还有葡萄糖氧化酶,b-半乳糖苷酶、溶菌酶和苹果酸脱氢酶等。由于HRP比活性高,稳定,分子量小,纯酶容易制备,所以较常使用。笔者采用的是过碘酸钠法,将辣根过氧化物酶(HRP)标记抗BGT多克隆抗体上。

抗体在保存过程中加入的叠氮钠会抑制HRP酶的活性,在酶标与抗体的连接前,用PBS溶液透析除去叠氮钠是非常重要的。选用了NaIO₄氧化HRP酶液经Sephadex-G25层析柱用醋酸钠缓冲液进行脱盐处理以除去过多的NaIO₄,也可以采用透析的方法除去过多的盐。在向氧化后的酶液中加入抗体后,立刻调节其最佳的碱性pH(9.6)为酶和抗体的充分结合提供了条件。

2.4.2 酶标抗体的纯化 酶标抗体的纯度对酶联免疫实验的灵敏度有很重要的影响。采用 Sephacryl S-200 凝胶柱对酶标抗体进行纯化。这一方法是采用了凝胶过滤层析的原理, 根据蛋白质分子大小不同而达到分离。因凝胶填料中的大量微孔, 只允许缓冲液及小于填料直径的小分子蛋白质通过, 而大分子蛋白质及一些蛋白复合物则被阻挡在外。因此, 高分子量的蛋白质流出的路径较短, 首先被洗脱下来, 而小分子则最后流出。通过上述原理可以得出在纯化过程中的第一个流出峰应为 HRP-Ab 的组分, 其次是未结合的抗体和游离 HRP, 经过这一过程就可以得到纯度较高的酶标抗体。在实验中收集第

一个峰的流出组分, 第二个峰为未结合的抗体和游离 HRP 流出峰。

经过这一步骤可以把酶标抗体溶液中未结合上酶标的抗体得以除去, 提高了酶标抗体的纯度, 保证了在以下的实验中加入同样体积和稀释度的酶标抗体溶液中酶标抗体的量。在酶标抗体中加入的硫柳汞具有防腐的作用, 延长保存时间。

2.5 酶标抗体的鉴定

紫外分光光度法测定酶标多抗 OD_{403nm} 和 OD_{280nm} 值分别为 0.20 和 0.226, 由此可得相关指标如下: 酶量 (mg/ml) = 0.20 × 0.4 = 0.080 mg/ml; 抗体量 (mg/ml) = (0.226 - 0.20 × 0.3) × 0.62 = 0.1029 mg/ml; 克分子

表2 直接ELISA测定酶标抗体

酶标抗体的稀释度/(μg/ml)	100	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	空白
BGT蛋白OD值	2.917	2.616	2.486	2.280	1.624	0.523	0.154	0.042

比值(E/P) = 0.08 × 4 / 0.1331 = 2.4; 标记率 = 0.20 / 0.226 = 88%。标记率为 88%, 克分子比为 2.4, 说明平均每个抗体分子上结合了 2.4 个辣根过氧化物酶分子。取得了较好的标记效果。

采用直接 ELISA, 5.0 μg/ml 浓度 BGT 蛋白取 100 ml 包被酶标板并封闭, HRP 标记多抗以 100 μg/ml 浓度开始进行 5 倍稀释加入 100 ml, 另设置空白对照, 测定各孔 OD_{450nm} 值, 结果见表 2, 酶标浓度稀释梯度与 BGT 测定浓度相吻合, 说明 BGT 能与酶标多抗发生特异性结合反应, 且酶标多抗 HRP-Ab 保持了

HRP 的酶催化活性。

酶免疫分析技术中, 酶标记物质量的好坏直接关系到免疫酶技术的成功与否, 因此被称为关键的试剂^[13]。辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)具有活力高、稳定、分子量小、易提纯等优点, 经过测定, 试验所用的酶的纯度和活力均符合实验要求, 因此最终选用 HRP 作为标记物, 而检测结果也证明, 标记后抗体能与 BGT 蛋白进行特异的结合。另外, HRP 标记多克隆抗体的常用方法是过碘酸钠法, 笔者采用该法对制备的多克隆抗体进行标记, 结

表3 直接ELISA测定酶标抗体结果

酶标抗体稀释倍数	BGT蛋白量/ng								回归方程	相关系数
	0	3.75	7.5	15	30	45	60	75		
100	0.108	0.341	0.521	0.824	1.379	1.697	1.822	1.859	y=0.018x+0.3587	0.9047
400	0.071	0.148	0.202	0.365	0.710	0.950	1.090	1.243	y=0.0122x+0.1163	0.9768
1000	0.062	0.095	0.127	0.201	0.396	0.541	0.635	0.777	y=0.0073x+0.0668	0.9929
2000	0.052	0.079	0.091	0.129	0.225	0.314	0.369	0.472	y=0.0041x+0.0532	0.9968
4000	0.052	0.052	0.052	0.055	0.057	0.063	0.065	0.073	y=0.0002x+0.0506	0.9676
8000	0.053	0.055	0.055	0.059	0.057	0.058	0.069	0.080	y=0.0002x+0.052	0.8056

果显示最终标记率能够达到 85% 以上, 酶活性和酶标多抗特异性鉴定结果均符合试验要求。

2.6 抗体夹心BGT-ELISA方法的建立和应用

2.6.1 酶标抗体工作浓度的确定 建立抗体夹心 ELISA, 需要选择合适的酶标抗体工作浓度。采用直接 ELISA 法做 BGT 梯度与酶标抗体浓度梯度的正交实验, 选择酶标抗体工作浓度。结果见表 3。

由表 3 可以看出当酶标抗体的浓度过高或过低

时, 所得曲线的相关系数都会有所降低, 当酶标抗体使用浓度过高, 在得到同样结果的情况下, 相应的会造成酶标抗体的浪费; 而酶标抗体稀释倍数太高, 其 OD 值又会大大的降低。由于笔者主要是为了大量定量检测样品中 BGT 的含量, 需要 OD 值处于一个相对较高的水平。本着经济的角度, 并综合考虑 OD 值与 BGT 量的相关性以及 OD 值的范围, 酶标抗体的工作浓度最终选定在 400~1000 倍。

表4 确定抗体包被浓度和酶标抗体最适浓度的结果

酶标抗体稀释倍数	包被的浓度/(g/ml)			
	8	5	2	1
	P/N			
1:1 000	1.86	2.07	2.25	2.11
1:800	1.68	2.11	2.51	2.41
1:400	1.91	2.03	2.32	2.20
1:200	2.15	2.18	2.56	2.39

2.6.2 抗体包被浓度的确定 采用棋盘滴定法,确定了抗体的包被浓度和酶标抗体的准确的稀释倍数,测定结果见表4。当抗体包被浓度为2 mg/ml,酶标

抗体的工作浓度为1:200时,P/N的值为最大,所以,确定抗体最适包被浓度为2 mg/ml,酶标抗体的最适工作浓度为1:200。

2.6.3 不同转基因白桦株系BGT含量的变化 采用优化的抗体夹心ELISA法,同时对转基因白桦的蛋白样品进行测定,以非转基因样品为阴性对照。转基因白桦株系5月份BGT含量的变化结果见表5。比较不同单株转基因白桦中BGT蛋白含量可以看出,除去本底因素的影响后,大多数转基因白桦的BGT蛋白都得到了表达,且阴性对照植株没有检测到BGT蛋白的表达,其他阳性的植株中BGT蛋白含

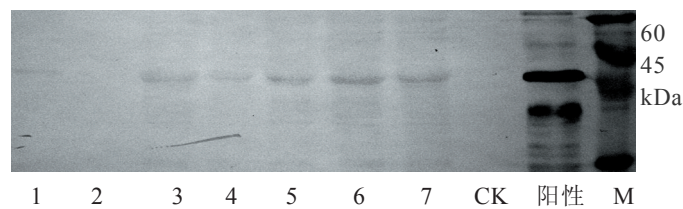


图6 转基因白桦BGT蛋白 Western blot 检测结果

表5 转基因白桦BGT蛋白含量的检测结果

转基因白桦编号	OD值	BGT蛋白含量/ng	总蛋白含量/ μ g	BGT相对含量/%	Western blot 检测结果
41	0.050	7.960	17.0	0.047	+
27	0.025	6.293	3.2	0.197	+
03	0.050	7.960	5.2	0.153	+
71	0.071	9.360	6.8	0.138	+
68	0.050	7.927	2.8	0.283	+
22	0.006	2.913	8.6	0.034	-
28	0.130	13.293	5.2	0.256	+
90	0.021	6.027	4.1	0.145	+
CK	-0.020	0	4.0	0	-

量占叶片可溶性总蛋白含量的0.05%~0.3%之间,最高可达到0.289%,不同转基因白桦BGT的表达量各不相同,大部分株系的表达量是在0.1%以上。

2.6.4 Western blot 检测 提取株转基因植株的蛋白,进行Western杂交,结果在51 kD左右得到了清晰的条带,而非转基因植株的蛋白则没有相应条带。如图6,TP22的BGT蛋白杂交没有信号而ELISA检测结果也表明BGT相对含量仅为0.034%,说明该无性系中**bgt**基因发生沉默或表达量极低。其他转基因无性系均有表达。Western杂交结果与ELISA检测基本一致,进一步说明了ELISA检测的结果可靠,该方法可进一步应用于转基因植物中BGT蛋白的检测。

3 结论

以纯化融合蛋白以此作为免疫抗原进行兔免

疫,制备了高纯度的抗体IgG。采用过碘酸钠法将抗体标记辣根过氧化物酶(HRP),得到第二抗体即酶标抗体,标记率为88%,具有良好的免疫性及特异性。通过酶标抗体工作浓度和抗体包被浓度的确定,建立了分析转基因白桦中BGT含量的抗体夹心ELISA方法。确定抗体最适包被浓度为2 mg/ml,酶标抗体的最适稀释浓度为1:200。采用优化的抗体夹心ELISA法,对转基因白桦的蛋白样品进行测定,多数转基因白桦的BGT蛋白都得到了表达,阳性的植株中BGT蛋白含量占叶片可溶性总蛋白含量的0.05%~0.3%之间,最高可达到0.289%。Western杂交结果与ELISA检测基本一致,进一步说明了ELISA检测的结果可靠,该方法可进一步应用于转基因植物中BGT蛋白的检测。

参考文献

- [1] Eun HC, Kwang KL, Ji HH, et al. Molecular cloning of two cDNAs encoding an insecticidal toxin from the spider, *Araneus ventricosus*, and construction of a recombinant baculovirus expressing a spider toxin[J]. Int J dust Entomo, 2002, 4(1): 43-49.
- [2] 林良斌, 官春云. Bt毒蛋白基因与植物抗虫基因工程[J]. 生物工程进展, 1997, 17(2): 51-56.
- [3] 詹亚光, 王玉成, 王志英, 等. 白桦的遗传转化及转基因植株的抗虫性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29(5): 380-386.
- [4] 郑树松, 安成才, 李启任, 等. 蜘蛛杀虫肽与Bt-Toxin C肽融合蛋白基因转入棉花的研究[J]. 棉花学报, 2002, 14(6): 348-351.
- [5] 张国财, 邹传山, 王志英. 欧美杨108号转蜘蛛杀虫肽与Bt毒蛋白嵌合基因转化系统的建立[J]. 东北林业大学学报, 2005, 33(6): 43-44.
- [6] 姜静, 常玉广, 董京祥, 等. 小黑杨转双价抗虫基因的研究[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(6): 669-672.
- [7] 孙冬, 詹亚光, 曾凡锁. 蜘蛛杀虫肽与Bt-toxin C肽融合蛋白(BGT)基因的原核表达与蛋白质纯化[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(5): 869-872.
- [8] 黎燕, 冯健男, 张纪岩主编. 分子免疫学实验指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [9] Franco EJ, Hofstetter H, Hofstetter OA. Comparative evolution of random and site-specific immobilization techniques for the preparation of antibody-based chiral stationary phases [J]. J Sep Sci, 2006, 29(10): 1458-1469.
- [10] Arakawa T, Tsumoto K, Nagase K, et al. The effects of arginine on protein binding in hydrophobic interaction and ion-exchange chromatography [J]. Protein Expr Purif, 2007, 54(1): 110-116.
- [11] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志, 1993, 3(2): 97-100.
- [12] Kobori H, Katsurada A, Miyata K, et al. Determination of plasma urinary angiotensinogen levels in rodents by newly developed ELIS[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(5): 1257-63.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.