

双抗体夹心 ELISA 在转基因生物检测中的应用研究

薛振华, 史文清, 王晓凤, 云鹏* (北京市畜牧总站, 北京 100107)

摘要 随着转基因产品种类和数量的不断增加, 转基因生物及其产品的安全性也越来越受到关注, 各国一直以来也都高度重视转基因生物及产品的管理。作为转基因生物安全评价的第一步, 转基因生物体的准确检测显得格外重要。该文综述了双抗体夹心 ELISA 方法的原理、技术要点及其在转基因植物及产品检测中的应用, 并对该方法在转基因动物检测中的应用前景进行分析, 为双抗体夹心 ELISA 方法的合理利用提供依据。

关键词 双抗体夹心 ELISA; 转基因生物; 转基因; 检测

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03476-01

Application of Double Antibody Sandwich ELISA Method in Testing Genetically Modified Organisms

XUE Zhen-hua, YUN Peng et al (Beijing Municipal Animal Husbandry General Station, Beijing 100107)

Abstract With the increasing of GMO (genetically modified organisms), the safety of GMO has attracted more and more worldwide attention. Governments of all countries give more priority to management genetically modified organisms and products. As a first step of GMO safety assessment, accurate detection of GMO is particularly important. This paper reviews the principle, key technology, its use in detecting transgenic plants and products of double antibody and sandwich ELISA method, and analyzes the application prospect in transgenic animals.

Key words Double antibody sandwich ELISA; Genetically modified organisms; Transgenic; Detection

转基因产品的检测与管理是世界性重大科技问题之一, 同时也是一个关乎政治、经济、贸易等多重领域的敏感问题。自 1994 年美国实现了转基因番茄的首次商业化之后, 转基因生物技术如今已被广泛应用于现代农业^[1]。目前, 在全球范围内, 已有 29 个国家种植了转基因作物, 被批准商业化的转基因生物超过 100 种, 种植面积达到 16 000 万 hm^2 ^[2]。很多国家将已批准的部分转基因作物作为食品或饲料的生产原料, 与此同时, 转基因产品的安全性受到了广泛关注^[3]。迄今关于转基因产品的安全性问题仍有争论, 因此需要建立转基因产品的检测技术平台, 多方位、长期、系统的监测和评价其安全性。

转基因生物检测主要包括基因水平检测和蛋白质水平检测, 也包括化学组织检测、生物测定检测和免疫荧光检测等。其中转基因生物基因水平检测包括定性 PCR 检测^[4]、定量 PCR 检测、RT-PCR 检测、Southern blot 检测、Northern 分析法和基因芯片检测等。转基因生物蛋白质水平检测包括 Western blot 检测、ELISA 检测^[5]、试纸条检测^[6]、双向电泳检测和蛋白芯片检测等。双抗体夹心 ELISA 检测方法具有准确性和灵敏度高、适用范围广和检测速度快的优点。笔者着重介绍该方法在转基因植物检测中的应用, 以期为转基因动物及其产品的检测提供参考。

1 双抗体夹心 ELISA 检测方法的原理和基本步骤

ELISA 检测方法分为直接 ELISA 检测方法、间接 ELISA 检测方法、双抗体夹心 ELISA 检测方法和竞争 ELISA 检测方法等; 其中双抗体夹心 ELISA 法是检测抗原最常用的方法。双抗体夹心 ELISA 包括直接夹心 ELISA 方法和间接夹心 ELISA 方法。直接夹心 ELISA 的基本步骤是将特异性抗体

包被固相载体, 形成固相抗体, 又称捕获抗体, 洗涤除去未结合的抗体及杂质; 加待检测样本, 使之与固相抗体接触反应一段时间 (37 °C 或室温反应 1 h), 让样本中的抗原与固相载体上的抗体结合, 形成固相抗原抗体免疫复合物; 洗涤除去其他未结合的物质, 加入酶标特异性抗体, 即检测抗体, 使固相免疫复合物上的抗原与酶标记抗体结合, 彻底洗除未结合的酶标记抗体, 此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量成正比; 加入显色底物, 免疫复合物中的酶催化底物形成有色产物。根据颜色反应的程度进行该抗原的判断。

2 双抗体夹心 ELISA 检测方法的技术要点

在 ELISA 实施过程中, 包被于固相载体表面的抗体的来源和制备方法对试验结果都有影响, 抗体的质量是试验成功与否的关键因素。ELISA 方法要求捕获抗体效价高、亲和力强。用于 ELISA 的抗体有多克隆抗体和单克隆抗体, 抗血清成分复杂, 应从中提取 IgG 才可用于包被固相载体; 含单克隆抗体的小鼠腹水中的特异性抗体含量较高, 有时可适当稀释后直接进行包被。直接夹心 ELISA 方法, 检测抗体是酶标记的特异性抗体, 酶标记的抗体也称为结合物。制备抗体酶结合物的方法通常有戊二醛法和过碘酸盐法, 用于制备酶结合物用的抗体要求有较高的纯度。间接夹心 ELISA 法, 不需要对检测抗体进行酶标记, 只需购买商品化二抗结合检测抗体即可。夹心 ELISA 反应条件的选择, 包括捕获抗体包被浓度的选择、酶标记物稀释浓度的选择、作用时间及其他影响方法灵敏度的条件的选择^[7-8]。

3 双抗体夹心 ELISA 方法在转基因植物及产品检测中的应用

ELISA 技术以其高灵敏度、高特异性的特点被广泛应用于转基因植物及其产品的检测, 是 1 对针对转基因植物中外源基因的表达产物来进行检测的技术方法。常见的外源蛋白检测方法为双抗体夹心 ELISA 检测方法。单克隆抗体只

基金项目 北京市农业局科技新星计划项目 (20120309); 现代农业产业技术体系北京市生猪创新团队建设项目建设。

作者简介 薛振华 (1983 -), 男, 山东梁山人, 畜牧师, 从事畜禽繁殖生物技术研究。* 通讯作者, 从事生物技术研究。

收稿日期 2013-12-27

(下转第 3540 页)

- [J]. 西北农业学报, 1995, 4(S1): 73-76.
- [7] 李良漠. 土壤硝化作用研究概况[J]. 土壤学进展, 1984(5): 1-9.
- [8] 付会芳, 李生秀. 土壤氮素矿化与土壤供氮能力[J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(S1): 57-60.
- [9] 苏德纯, 王敬国, 曹一平. 麦田土壤可矿化氮的动态与供氮规律的研究[J]. 北京农业大学学报, 1995, 21(S1): 57-60.
- [10] QUEMADA M, CABRERA M L. Temperature and moisture effects on C and mineralization from surface applied clover residue[J]. Plant and soil, 1997, 189: 127-137.
- [11] 刘育红, 吕军. 稻田土壤氮素矿化的几种方法比较[J]. 土壤通报, 2005, 36(5): 675-678.
- [12] 杨路华, 沈荣开. 农田水分与土壤氮素矿化的试验研究[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(4): 191-193.
- [13] 唐咏, 梁成华, 刘志衡. 日光温室栽培对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(1): 16-19.
- [14] STANFORD G, SMITH S J. Nitrogen mineralization potentials of soils[J]. Soil Sci Soc Amer Proc, 1972, 36: 465-472.
- [15] 李菊梅, 王朝辉, 李生秀. 有机质、全氮和可矿化氮在反映土壤供氮能力方面的意义[J]. 土壤学报, 2003, 40(2): 232-237.
- [16] 杜建军, 王新爱, 王夏晖, 等. 旱地土壤氮素、有机质状况及与作物吸氮量的关系[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(1): 11-15.
- [17] SIMS J L, WELLS J P, TACKETT D L. Predicting nitrogen to rice from-field and reservoir soils[J]. Soil Sci Soc Am Proc, 1967, 31: 672-675.
- [18] STANFORD G, CARTER J N, SMITH S J. Estimates of potentially mineralizable soil nitrogen based on short-term incubations[J]. Soil Sci Soc Am Proc, 1974, 38: 99-102.
- [19] 周鸣铮, 于文涛, 方樟法. 土壤速效氮的测定方法[J]. 土壤, 1976(5/6): 316-323.
- [20] 周祖澄, 王洪玉, 金振玉, 等. 吉林省旱地土壤速效氮测定方法的研究[J]. 土壤通报, 1981(6): 23-26.
- [21] GASSER J K R, KALEMBASA S J. Soil nitrogen IX. The effects of leys and organic matter manures on the available N in clay and sand soils[J]. J Soil Sci, 1976, 27: 237-249.
- [22] RYAN J A, SIMS J L, PEASLEE D E. Laboratory methods for estimating plant available nitrogen in soil[J]. Agron J, 1971, 63: 48-51.

(上接第 3476 页)

针对单一抗原决定簇, 主要优点是特异性高, 亲和力高。多克隆抗体是针对免疫抗原多个不同抗原决定簇的免疫球蛋白的混合物, 主要优点是制备时间所需时间短、费用低。兔多克隆抗体、羊多克隆抗体、鼠单克隆抗体已被广泛应用于 ELISA 检测 Bt 蛋白。Paul 等开发的一种检测 CryAb 蛋白的双抗体夹心 ELISA 法, 他们使用的抗体是多克隆抗体, 捕获抗体和检测抗体分别为原始抗体和生物素标记的抗体, 其双抗体夹心体系显示多克隆抗体对 CryAb 的检测范围为 0.4~100.0 ng/ml, 回收率为 89%~106%^[9]。Guerler 等在研究 CryAb 蛋白在生物体内的转换时, 其建立的 ELISA 体系对 Cry1Ab 蛋白的分析检测限为 0.4 ng/ml, 与同时进行的实时荧光 PCR 比较, ELISA 方法的检测特异性更高^[10]。

浙江大学倪庚使用兔多克隆抗体和鼠单克隆抗体建立了 3 种可检测转基因食品中 Cry1Ac 蛋白的 ELISA 检测方法, 分别为间接 ELISA、单抗-抗原-酶标多抗夹心 ELISA 和多抗-抗原-酶标单抗夹心 ELISA, 分析对比了 3 者的灵敏度、线性检测范围, 确定了比较理想的 ELISA。其中间接 ELISA 方法的最低检测限为 50 ng/ml, 其线性检测范围为 100~400 ng/ml; 单抗-抗原-酶标多抗夹心 ELISA 其最低检测限为 0.24 ng/ml, 其线性检测范围为 0.975~62.500 ng/ml; 多抗-抗原-酶标单抗夹心 ELISA 其最低检测限为 1.95 ng/ml, 其线性检测范围为 3.9~62.5 ng/ml。结果证明, 单抗-抗原-酶标多抗的检测限浓度最低, 线性检测范围最广, 因此, 单抗-抗原-酶标多抗法是比较理想的一种 ELISA 方法^[11]。

4 双抗体夹心 ELISA 方法在转基因动物及产品检测中的应用前景

近些年来, 与转基因相伴而生的生物安全问题引起了公众和管理部门的强烈关注和高度重视。因此, 建立并应用精准、快速的检测技术进行科学、系统地进行生物安全评价, 就显得尤其重要。由于转基因动物(猪、牛、羊等)因个体较大, 饲喂及隔离措施普遍要求较高, 因此在检测技术研究领域,

亟需研究开发能够满足现场条件的快速检测方法。双抗体夹心 ELISA 方法具备多克隆抗体费用较低、单克隆抗体亲和力高的特点, 使得后续研究开发的试剂盒检测成本低廉, 结果迅速, 灵敏可靠, 而且可以稳定、方便地提供准化的试剂, 便于实现工业化生产。目前, 中国检验检疫科学研究院已开展利用多克隆抗体和单克隆抗体建立双抗体夹心 ELISA 方法检测转基因奶牛的研究^[12]。同时, 双抗体夹心 ELISA 检测方法的研究和建立, 为制备的免疫胶体金试纸条提供了便利, 为建立转基因动物的现场、快速查验技术打下基础, 所以这种检测方法将是转基因动物检测领域研究的主要方向之一。

参考文献

- [1] OGUCHI T, ONISHI M, CHIKAGAWA Y, et al. Development of event-specific quantitation method for GA21 maize, which is a gm event without CaMV35S promoter[J]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2008, 49(1): 16-22.
- [2] JAMES C. Brief 43: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011[R]. Ithaca, NY: ISAAA, 2011.
- [3] 翟聪聪, 陈洪俊, 李志红, 等. 转基因产品检测技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1900-1901, 2097.
- [4] GERMINI A, ZANETTI A, SALATI C, et al. Development of a seven-target multiplex PCR for the simultaneous detection of transgenic soybean and maize in feeds and foods[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(11): 3275-3280.
- [5] URBANEK K B, SAWILSKA R D, JEDRA M, et al. Detection of genetic modification in maize and maize products by ELISA test[J]. Rocznik Panstw Zakl Hig, 2003, 54(4): 345-353.
- [6] 袁铁琰, 张大兵, 王全喜, 等. 试纸条技术在转基因农作物检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2004(5): 37-39.
- [7] 李志勇. 食品安全 ELISA 快速检测技术[M]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] 王硕. 酶联免疫吸附分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [9] PAUL V, STEINKE K, MEYER H H D. Development and validation of a sensitive enzyme immunoassay for surveillance of Cry1Ab toxin in bovine blood plasma of cows fed Bt-maize (MON810)[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 607: 106-113.
- [10] GUERTLER P, PAUL V, ALBRECHT C, et al. Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and Cry 1 Ab protein from feed into bovine milk[J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 393: 1629-1638.
- [11] 倪庚. Cry1Ac 蛋白 ELISA 检测体系的建立[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [12] 朱振营. 转基因牛奶及奶制品中人乳铁蛋白夹心 ELISA 检测方法的建立[C]//朱士恩, 张贵学. 中国畜牧兽医学动物繁殖学分会第十六届学术研讨会论文集. 哈尔滨: 中国畜牧兽医学, 2012.