

定量检测转基因植物蛋白 Cry1Ac 的双抗体夹心 ELISA 方法建立

吕雪飞¹, 周晓萍², 满燕¹, 张经华², 王鹏举¹, 刘洋²

(1. 北京理工大学生命学院, 北京 100081) (2. 北京市理化分析测试中心, 北京 100094)

摘要: 以典型且研究较多的抗虫 Cry1Ac 基因表达的 Cry1Ac 蛋白为检测目标, 制备其单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体, 在优化抗体纯化方案, 获得纯化抗体的基础上, 以 Cry1Ac 单克隆抗体为包被抗体, 以辣根过氧化物酶标记的 Cry1Ab 单克隆抗体为检测抗体, 建立了 Cry1Ac 蛋白的双抗体夹心酶联免疫吸附分析 (ELISA) 检测法, 并用于玉米中 Cry1Ac 蛋白含量的检测。结果显示, 所建立的双抗体夹心 ELISA 法稳定性较好, 测定变异系数在 3% 以内; 在 10 ng/mL~200 ng/mL 的浓度范围内, 线性回归方程为 $y = 0.0114x + 0.0768$ ($R^2 = 0.9989$), 检测限为 9.49 ng/mL; 对玉米样品提取液中 Cry1Ac 蛋白含量的测定回收率在 102.5%~103% 范围内。本研究所建立的双抗体夹心 ELISA 法为玉米中 Cry1Ac 蛋白的定量检测提供了有效的手段, 可作为一种潜在的检测方法用于转基因产品的检验检疫中, 在出入境检验检疫工作中也有较高的应用价值。

关键词: 转基因植物; Cry1Ac 蛋白; ELISA; 免疫分析

文章编号: 1673-9078(2014)10-257-262

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.043

Double-antibody Sandwich ELISA for the Quantitative Detection of Cry1Ac Protein in Transgenic Plants

LV Xue-fei¹, ZHOU Xiao-ping², MAN Yan¹, ZHANG Jing-hua², WANG Peng-ju¹, LIU Yang²

(1. School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

(2. Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

Abstract: In this study, Cry1Ac protein, encoded by insect-resistance gene *Cry1Ac*, was selected as the target antigen and its monoclonal antibody and horseradish peroxidase labeled anti-monoclonal antibody were prepared. Using optimized antibody purification techniques, the purified antibody was obtained and double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection of Cry1Ac protein in corn. Cry1Ac monoclonal antibody was used as the coating antibody and horseradish peroxidase-labeled Cry1Ab monoclonal antibody was used as the detection antibody. The results showed that the newly developed ELISA had good stability and the coefficient of variation was within 3%. In the concentration range of 10~200 ng/mL, the linear regression equation was $y = 0.0114x + 0.0768$ ($R^2 = 0.9989$), while the detection limit of the assay was 9.49 ng/mL. The recoveries of Cry1Ac in corn extract ranged from 102.5% to 103%. The established sandwich ELISA provides an effective method for the quantitative detection of Cry1Ac protein in corn and is therefore a promising detection method for the inspection and quarantine of transgenic products and may have high application value in entry-exit inspection and quarantine.

Keywords: transgenic plants; Cry1Ac protein; enzyme-linked immunosorbent assay; immunoassay

自 1983 年首次报道植物的遗传转化以来, 人们已利用转基因技术成功培育出了许多转基因植物的新品种, 并在农业生产中进行推广应用, 获得了显著的经济效益。转基因植物在提高作物产量、改善作物品质、减少农药使用量等方面发挥着重要的作用。与此同时, 收稿日期: 2014-04-17

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2008BAK41B02); 国家自然科学基金资助项目 (21275019); 北京市科学技术研究院萌芽计划 (2012 年)
作者简介: 吕雪飞 (1979-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物分离分析
通讯作者: 周晓萍 (1985-), 女, 硕士, 研究方向: 生物分离分析

随着转基因植物的大面积种植以及转基因生物的商品化发展, 有关转基因植物本身的安全性及其对人类健康和生态环境潜在影响的争论也日趋激烈, 转基因产品是否对人类无毒、无副作用, 是否与非转基因产品“实质等同”、无显著差异, 转基因生物是否会对环境造成灾难等^[1]。因此, 在进行转基因食品研究、开发和商业化的同时, 必须对转基因食品的安全性进行综合评估, 建立恰当的方法对转基因食品中转基因成分进行快速鉴定与检测。目前, 转基因产品的检测主要有聚合酶链式反应 (PCR) 和酶联免疫吸附测定

(ELISA)方法^[1-2]。其中,ELISA技术是基于抗原与抗体特异性结合以及酶对底物高效催化特性的一种检测技术,具有快速、简单、低耗和结果客观易判定等优点,是转基因食品较可靠的检测手段之一。

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)是一种革兰氏阳性菌,在芽孢形成过程中,它可以产生大量的伴胞晶体,对鳞翅目和鞘翅目的一些害虫具有一定的毒杀作用,通常也被称为 δ -内毒素或Bt杀虫蛋白^[3-4]。Bt基因是目前应用最为广泛和最有潜力的一种抗虫基因,已有近70种植物被转入了Bt基因而获得了抗虫性^[5]。Cry1Ac蛋白是一种典型的并且被广泛研究的Bt杀虫蛋白,存在于很多抗虫转基因作物中,如玉米、土豆、棉花和水稻等^[6-8],其产量也在逐年增加。然而,关于转基因食品中Cry1Ac蛋白的ELISA检测方法很有限。

Shah等^[9]建立了双抗体夹心ELISA法用于检测转基因棉花中Cry1Ac蛋白,使用了两种不同的单克隆抗体Kbt和158E6-HRP,其中Kbt作为包被抗体,158E6-HRP作为检测抗体,该方法的最低检测限为0.5 ng/mL,定量检测范围为0.1~0.375 μ g/g(Cry1Ac蛋白重量/干燥棉花组织重量)。王硕^[10]等开发出了Bt棉花中Cry1Ac蛋白的双抗夹心ELISA检测方法,该ELISA检测体系中所用抗体为多抗,包被抗体和检测抗体分别为原始抗体和HRP标记抗体,方法的最低检测限为5 ng/mL,其线性检测范围为16~250 ng/mL。

本研究以Cry1Ac为研究对象,以Cry1Ac单克隆抗体为包被抗体,以辣根过氧化物酶(HRP)标记的Cry1Ab单克隆抗体为检测抗体,建立了Cry1Ac蛋白的双抗体夹心ELISA检测法,并用于转基因玉米中Cry1Ac蛋白含量的检测。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

BALB/c小鼠,6周龄,购自扬州大学。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和酪蛋白购自美国Sigma公司。胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司。RPMI-1640培养基购自Hyclone公司。PEG4000购自美国Merck公司。96孔和24孔细胞培养板、25 cm²和75 cm²细胞培养瓶、15 mL和50 mL离心管、96孔酶标板均购自美国CORNING公司。HAT和HT培养基购自GIBCO公司。Cry1Ac蛋白购自美国Envirologix公司。辣根过氧化物酶(HRP)购自上海国源生物技术有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自江阴泰诺公司。羊血清购自郑州益康公

司。高碘酸钠、硼氢化钠、三水合乙酸钠、乙酸(冰醋酸)和硫酸铵等化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。玉米样品来源于上海嘉定区安亭镇一农田。酶标仪为Thermo Scientific公司产品。紫外可见光光谱仪为Perking Elmer公司产品。

1.2 单克隆抗体的制备

(1)免疫BALB/c小鼠:选用6周龄的雌性BALB/c小鼠(8只)作为免疫动物,Cry1Ac和Cry1Ab分别与等量弗氏完全佐剂乳化后,对实验小鼠采用皮下多点注射(100 μ g/只),每种蛋白分别注射4只小鼠。加强免疫2次,两次免疫间隔4周。最后一次加强免疫后一周断尾采血,分离血清,分别以Cry1Ac和Cry1Ab为抗原测定小鼠血清抗体效价。

(2)杂交瘤细胞的建立:细胞融合时提前3 d分别用30 μ g Cry1Ac和Cry1Ab对融合小鼠进行加强免疫。选择状态良好的、对HAT敏感的SP2/0细胞株,免疫鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP2/0按1:1混合,聚乙二醇-4000为融合剂,将融合好的细胞铺进96孔细胞培养板,用HAT培养液进行培养,三天后换液,改用HT培养液。用ELISA法筛选阳性克隆孔,有限稀释法克隆3次至阳性率达到100%,细胞建株,扩大培养,并液氮冻存杂交瘤细胞株。

(3)单克隆抗体的制备:取7周龄BALB/c小鼠腹腔注射液体石蜡,每只小鼠0.2 mL。10 d后腹腔接种10⁶左右的杂交瘤细胞。7~10 d后小鼠腹部明显膨大,用弯头滴管采集腹水,间接ELISA测定腹水抗体效价。

(4)抗体的纯化:小鼠腹水离心15 min(2000 r/min,室温),挑去上层油脂,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30 min,离心30 min(13000 r/min,4 $^{\circ}$ C),弃上清;沉淀溶于适量PBS(0.01 M,pH 7.4);在4 $^{\circ}$ C搅拌下逐滴缓慢加入饱和硫酸铵至33%,继续搅拌30 min,离心30 min(13000 r/min,4 $^{\circ}$ C),弃上清;沉淀溶于适量PBS(0.01 M,pH 7.4),4 $^{\circ}$ C透析过夜,测定蛋白质含量,-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5 mL超纯水过柱,再用5 mL 0.4 M PB缓冲液(pH 7.0)平衡纯化小柱;抗体缓慢过柱,以求抗体蛋白更好的结合在结合位点上;继续10 mL 0.4 M PB缓冲液(pH 7.0)平衡纯化小柱;5 mL 0.1 M甘氨酸-盐酸缓冲液(pH 7.0)洗脱结合位点上的抗体,并加入1 M Tris-HCl(pH 2.7)中和甘氨酸,使pH保持为适合抗体保存的中性;10 mL 0.4 M PB缓冲液(pH 7.0)平衡纯化小柱;5 mL 20%乙醇溶液过柱,于4 $^{\circ}$ C条件下保存纯化小柱。

1.3 酶标抗体的制备

(1) 称取4 mg HRP溶于1 mL纯水中, 加入200 μ L 100 mM高碘酸钠(现配现用), 4 $^{\circ}$ C搅拌20 min, 至溶液呈墨绿色;

(2) 将上述溶液置于1 mM pH 4.4醋酸缓冲液中透析过夜;

(3) 用0.1 M碳酸盐缓冲液调上述HRP溶液pH为9.0;

(4) 分别将6 mg Cry1Ab和Cry1Ac的单克隆抗体加入HRP溶液中, 4 $^{\circ}$ C搅拌2 h;

(5) 继续加入100 μ L 4 mg/mL硼氢化钠, 4 $^{\circ}$ C避光搅拌2 h;

(6) 使用pH 8.5硫酸铵饱和溶液对以上溶液进行硫酸铵沉淀, 离心之后管底所得褐色沉淀物即为实验所得酶标抗体。

1.4 Cry1Ac 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建

立

(1) 配制试剂

包被液: 将0.3 g Na_2CO_3 和0.58 g NaHCO_3 用双蒸水溶解, 定容至100 mL。

稀释液: 将3.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、8.0 g NaCl 、0.2 g KCl 和 Casein 1.0 g 用双蒸水溶解, 定容至1000 mL。

洗涤液: 将3.35 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、8.0 g NaCl 、0.2 g KCl 和 2.0 mL Tween-20 用双蒸水溶解, 定容至1000 mL。

(2) 包被

将Cry1Ac单抗用包被液按照1:100倍稀释, 100 μ L/孔, 加入到96孔酶标板中, 4 $^{\circ}$ C过夜; 用洗涤液清洗包被板3次, 300 μ L/孔。

(3) 封闭

用10%羊血清封闭(用包被液按照1:9倍稀释), 150 μ L/孔, 恒温37 $^{\circ}$ C封闭3 h; 用洗涤液清洗包被板3次, 300 μ L/孔。

(4) 样品前处理

取玉米15 g, 放入匀质机磨碎; 称取5 g磨碎后的玉米粉, 加入25 mL稀释液, 振荡10 min; 4000 g离心10 min, 取上清液进行检测。

(5) 加样

加入浓度梯度为0、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL和400 ng/mL的Cry1Ac蛋白标准品、玉米样品以及玉米样品中添加Cry1Ac, 100 μ L/孔; 37 $^{\circ}$ C, 温育60 min; 用洗涤液清洗包被板3次, 300 μ L/孔。

(6) 加酶标抗体

加入酶标抗体(1:100), 37 $^{\circ}$ C, 温育60 min; 用洗涤液清洗包被板3次, 300 μ L/孔。

(7) 显色反应

加入TMB, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C反应15 min。

(8) 终止反应

加入2 M H_2SO_4 终止反应, 100 μ L/孔。

(9) 检测

450 nm 下读取 OD (吸光度) 值。

2 结果与讨论

2.1 血清效价测定

表1 血清效价的测定

Table 1 Determination of serum antibody titers

稀释 倍数	10 μ g/mL Cry1Ac 包被		1 μ g/mL Cry1Ac 包被		0.1 μ g/mL Cry1Ac 包被	
	Cry1Ab 单抗	Cry1Ac 单抗	Cry1Ab 单抗	Cry1Ac 单抗	Cry1Ab 单抗	Cry1Ac 单抗
10^1	3.543	3.711	3.267	3.464	2.711	3.013
10^2	3.567	3.874	2.962	3.122	2.163	2.642
10^3	2.984	3.331	2.062	2.431	1.488	2.054
10^4	1.764	2.634	1.563	1.899	0.892	1.477
10^5	1.035	1.762	0.877	1.231	0.571	0.853
10^6	0.663	0.993	0.442	0.752	0.223	0.471
10^7	0.341	0.448	0.273	0.344	0.073	0.189
10^8	0.124	0.217	0.105	0.147	0.071	0.076

以三个不同浓度的 Cry1Ac 蛋白(0.1 μ g/mL、1 μ g/mL 和 10 μ g/mL) 包被酶标板, 血清稀释倍数在 $10^1 \sim 10^8$ 范围内, 采用 ELISA 的方法分别测定 Cry1Ab

和 Cry1Ac 的抗血清效价, 结果见表1所示。可以看出, 在三个不同的包被浓度下, 随着血清稀释倍数的加大, 所得 OD 值均逐渐降低, 按照比本底高 2.1 倍

的原则(其中本底值为0.087),血清效价在10⁷以上,效价满足实验要求,可以用于下一步的实验。

2.2 抗体纯化方法及抗体配对优化

对于制得的 Cry1Ac 单克隆抗血清,分别选择了硫酸铵沉淀、Protein G 纯化、硫酸铵沉淀与 Protein G 相结合的纯化方法进行纯化,以硫酸铵沉淀法纯化得到的 HRP 标记的 Cry1Ab 单克隆抗体为检测抗体,将三种不同纯化方法所得的抗体用于不同浓度 Cry1Ac 蛋白(100 ng/mL、50 ng/mL 和 25 ng/mL)的检测,实验结果见表 2 所示。在三种不同的纯化方案中,二步纯化法所得抗体在用于 100 ng/mL Cry1Ac 蛋白的检测时,OD 值(1.474)高于硫酸铵沉淀(OD 值 1.333)和 Protein G 纯化方案(OD 值 1.385)所得的 OD 值。同样,对 50 ng/mL 和 25 ng/mL Cry1Ac 蛋白而言,所得实验结果与上述一致。因此实验中选择了硫酸铵沉淀后 Protein G 纯化的二步纯化方案,并将此法纯化所得的单克隆抗体用于后续的实验。

表 2 硫酸铵沉淀、Protein G 纯化、二步纯化的抗体测定不同浓度 Cry1Ac 蛋白的 OD 值

Table 2 OD values for different concentrations of Cry1Ac protein determined using the antibody purified by ammonium sulfate precipitation, protein G purification, and two-step purification methods

Cry1Ac (ng/mL)	硫酸铵 沉淀	Protein G 纯化	硫酸铵+Protein G 纯化
100	1.333	1.385	1.474
50	0.742	0.830	0.869
25	0.410	0.430	0.596
0	0.238	0.166	0.226

注:实验用的包被抗体为 Cry1Ac 单克隆抗体,检测抗体为硫酸铵沉淀法纯化得到的 HRP 标记的 Cry1Ab 单克隆抗体,两种抗体稀释度均为 1:100。

为了进一步进行抗体配对的优化,实验中还对 Cry1Ab 单克隆抗体为包被抗体,硫酸铵沉淀法纯化得到的 HRP 标记的 Cry1Ac 单克隆抗体为检测抗体,用于三种不同浓度 Cry1Ac 蛋白(100 ng/mL、50 ng/mL 和 25 ng/mL)的检测,结果见表 3 所示。与以 Cry1Ac 单克隆抗体为包被抗体的结果相比(表 2),可以看出,除 100 ng/mL Cry1Ac 的检测 OD 值略高外(Cry1Ac 单克隆抗体为包被抗体时,OD 值为 1.474; Cry1Ab 单克隆抗体为包被抗体时,OD 值为 1.876),其余两个浓度的测定 OD 值相当。所以,可以认为,两种抗体配对方案,都可以用于 Cry1Ac 蛋白的检测。在后续的实验,我们选择了以 Cry1Ac 单克隆抗体为包被

抗体,HRP 标记的 Cry1Ab 单克隆抗体为检测抗体进行相关研究。

表 3 Cry1Ab 单克隆抗体为包被抗体测定不同浓度 Cry1Ac 蛋白的 OD 值

Table 3 OD values for different concentrations of Cry1Ac protein determined using Cry1Ab monoclonal antibody as coating antibody

Cry1Ac (ng/mL)	包被 Cry1Ab 单克隆抗体
100	1.876
50	0.884
25	0.594
0	0.292

注:实验中用的包被抗体为二步纯化法得到的 Cry1Ab 单克隆抗体,检测抗体为硫酸铵沉淀法纯化得到的 HRP 标记的 Cry1Ac 单克隆抗体,两种抗体稀释度均为 1:100。

2.3 双抗体夹心 ELISA 方法的稳定性考察

表 4 双抗体夹心 ELISA 法测定 Cry1Ac 蛋白稳定性的考察

Table 4 Stability of double-antibody sandwich ELISA for Cry1Ac protein quantification

Cry1Ac	OD 值						C.V./%
25 ng/mL	0.522	0.572	0.547	0.531	0.561	0.553	0.6
50 ng/mL	0.834	0.812	0.822	0.836	0.841	0.827	1.2
100 ng/mL	1.423	1.377	1.402	1.385	1.412	1.391	2.7

将所建立的双抗体夹心 ELISA 法用于三种不同浓度 Cry1Ac(25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL)的测定,每个浓度平行测定 6 次,计算变异系数(C.V.%)。从表 4 所示的结果中可以看出,对于 25 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL Cry1Ac 蛋白的测定,方法的变异系数分别为 0.6%、1.2% 和 2.7%,这表明所建立的双抗体夹心 ELISA 法稳定性较好,可以用于 Cry1Ac 蛋白的定量检测。

2.4 标准曲线

配制一系列浓度梯度的 Cry1Ac 蛋白标准品溶液(5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL 和 400 ng/mL),用所建立的双抗体夹心 ELISA 方法进行测定,根据检测结果,以浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,结果如图 1 所示。从图 1a 所示的趋势线可以看出,在浓度范围为 5 ng/mL~400 ng/mL 的整个区域内,低于 10 ng/mL 和高于 300 ng/mL 时,线性相关性不好。在浓度范围为 10 ng/mL~200 ng/mL 的区域内,根据线性回归公式,得到线性回归方程 $y = 0.0114x + 0.0768$,

$R^2=0.9989$ (图 1b)。根据文献^[21]中检测限的计算方法,即将空白的平均值代入到标准曲线中,计算所得的浓度即为方法的检测限。本实验所得空白的平均值为 0.185,代入到线性回归方程中,计算所得的检测限为 9.49 ng/mL。

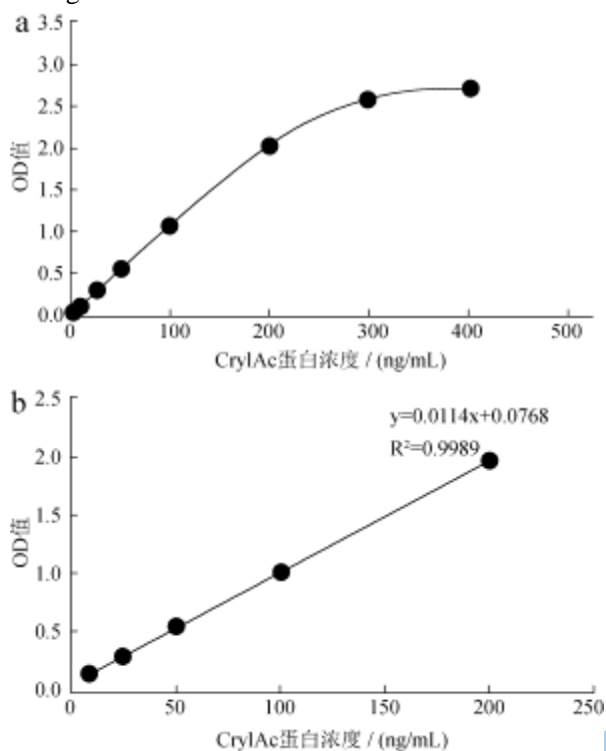


图 1 用所建立的 ELISA 方法测定不同浓度 Cry1Ac 蛋白

Fig.1 Measurement of different Cry1Ac protein concentrations using the newly developed ELISA method

注: a: 趋势线; b: 标准曲线。

2.5 实际样品的检测

表 5 样品中 Cry1Ac 蛋白含量的检测

Table 5 Detection of Cry1Ac protein content in samples

样品	OD 值	计算所得浓度/(ng/mL)	回收率/%
样品 1 ^a	0.0825	0	
样品 2 ^b	0.5465	41.2	103.0
样品 3 ^c	1.0120	82.0	102.5

注: ^a样品 1 为玉米样品提取液; ^b样品 2 为样品 1 提取液添加 40 ng/mL Cry1Ac 蛋白; ^c样品 3 为样品 1 提取液添加 80 ng/mL Cry1Ac 蛋白。

将所建立的双抗体夹心 ELISA 法用于玉米样品中 Cry1Ac 蛋白的定量检测,所得 OD 值代入到图 1b 的标准曲线中,计算 Cry1Ac 蛋白的含量,结果见表 5。结果表明,购自上海嘉定区安亭镇一农田的玉米样品提取液并未检测到 Cry1Ac 蛋白,在此玉米提取液中添加 40 ng/mL Cry1Ac 蛋白后,检测得到的浓度为 41.2 ng/mL,计算其回收率为 103.0%。同样地,在此玉米

提取液中添加 80 ng/mL Cry1Ac 蛋白后,检测得到的浓度为 82 ng/mL,计算其回收率为 102.5%。

3 结论

在制备单克隆抗体和 HRP 酶标抗体、优化抗体纯化方案的基础上,建立了转基因玉米中 Cry1Ac 蛋白的双抗体夹心 ELISA 检测法。此方法稳定性较好,测定变异系数在 3% 以内。在 10 ng/mL~200 ng/mL 的浓度范围内,线性回归方程为 $y=0.0114x+0.0768$ ($R^2=0.9989$),检测限为 9.49 ng/mL,玉米样品中 Cry1Ac 蛋白的测定回收率在 102.5%~103% 范围内。研究表明,所建立的双抗体夹心 ELISA 方法为玉米中 Cry1Ac 蛋白的定量检测提供了有效的手段,可作为一种潜在的检测方法用于转基因产品的检验中,在出入境产品的检验检疫工作中也有较高的实用价值。

参考文献

- [1] 刘光明,苏文金,陈向峰.应用 ELISA 定量检测转基因玉米中 Bt1 蛋白的研究[J].食品科学,2002,23(8):217-221
LIU Guang-ming, SU Wen-jin, CHEN Xiang-feng. Quantitative assay of bt i protein in genetically modified maize by ELISA [J]. Food Science, 2002, 23(8): 217-221
- [2] Zhao Z Y, Chen Y S, Xu W Z, et al. Surface plasmon resonance detection of transgenic cry 1ac cotton (*Gossypium spp.*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(12): 2964-2969
- [3] 魏俊杰,陈梅香,张晓丽.抗虫转基因玉米研究[J].安徽农业科学,2012,40(10):5928-5930
WEI Jun-jie, CHEN Mei-xiang, ZHANG Xiao-li. Study of insect-resistant transgenic corn [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(10): 5928-5930
- [4] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants [J]. Plant and Soil, 2004, 266(1-2): 77-89
- [5] 崔林开,叶华智 3 种 ELISA 法检测 Bt 杀虫蛋白的比较研究 [J].安徽农业科学,2005,33(11):2056-2057
CUI Lin-kai, YE Hua-zhi. Comparison among Three ELISA methods for bt toxin protein [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2005, 33(11): 2056-2057
- [6] 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 CryIAb protein from feed into bovine milk [J]. Analytical and Bioanalytical

- Chemistry, 2009, 393(6-7): 1629-1638
- [7] Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants [J]. Annual Review of Entomology, 2002, 47(1): 845-881
- [8] Berdal KG, Hoist JA. Roundup Ready (R) soybean event-specific real-time quantitative PCR assay and estimation of the practical detection and quantification limits in GMO analyses [J]. European Food Research Technology, 2001, 213(6): 432-438
- [9] Shah G, Embrey SK, Schafer BW. A highly specific enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cryIac insecticidal crystal protein in transgenic widestrike cotton [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(15): 5974-5979
- [10] Wang S, Guo A Y, Zheng W J, et al. Development of ELISA for the determination of transgenic bt-cottons using antibodies against cryIac protein from bacillus thuringiensis HD-73 [J]. Engineering in Life Sciences, 2007, 7(2): 149-154
- [11] Walschus U, Witt S, Wittmann C. Development of monoclonal antibodies against cryIab protein from bacillus thuringiensis and their application in an ELISA for detection of transgenic bt-maize [J]. Food and Agricultural Immunology, 2002, 14(4): 231-240

欢迎订阅 EI 收录期刊、中文核心期刊

《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620

每期定价 15 元，全年 12 期仅 180 元。欢迎食品及相关行业的机构和科学工作者到各地邮局订阅，并踊跃投稿或建立广告宣传和产学研合作关系。

地址：广州五山华南理工大学轻工与食品学院麟鸿楼 508，邮编：510640

电话：020-87113352

E-mail: xdspkj@126.com

投稿系统: www.xdspkj.cn