

郎刚华, 顾立众, 李西腾. 大米  $\alpha$ -球蛋白的原核表达、抗体制备及检测[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(11): 34-37, 113.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.009

# 大米 $\alpha$ -球蛋白的原核表达、抗体制备及检测

郎刚华, 顾立众, 李西腾

(江苏食品药品职业技术学院, 江苏淮安 223003)

**摘要:**大米  $\alpha$ -球蛋白是大米胚乳中主要的盐溶蛋白,也是大米的主要致敏原之一。为了建立起大米  $\alpha$ -球蛋白的检测分析方法,将大米  $\alpha$ -球蛋白的编码基因亚克隆到表达载体 pQE30 中,并在大肠杆菌中进行了重组大米  $\alpha$ -球蛋白的表达。通过金属亲和层析法对重组大米  $\alpha$ -球蛋白进行纯化,以纯化的重组大米  $\alpha$ -球蛋白为抗原免疫白兔,制备出了抗大米  $\alpha$ -球蛋白多克隆抗体。Western Blotting 检测结果显示,该抗体能够特异性地与大米  $\alpha$ -球蛋白进行免疫结合反应,抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体与目标蛋白的结合呈现出一定的定量关系。并且,利用该抗体构建起了大米  $\alpha$ -球蛋白的 ELISA 检测分析方法,并对 3 种大米样品中  $\alpha$ -球蛋白的含量进行了检测分析。

**关键词:**大米;  $\alpha$ -球蛋白; 原核表达; 抗体; 检测分析; Western Blotting; ELISA

**中图分类号:** TS201.2<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0034-04

水稻是世界三大重要的粮食作物之一,世界上半以上的人口以大米为主食。大米为人们提供了必需的淀粉、蛋白质、脂类、维生素和微量元素等。大米的蛋白质成分影响着大米的营养价值、口感及深加工过程。大米蛋白质可以分为水溶性的清蛋白、盐溶性球蛋白、醇溶蛋白和碱溶性谷蛋白<sup>[1]</sup>。大米中的贮存蛋白质聚集成 2 种蛋白体,即蛋白体 I 和蛋白体 II。蛋白体 I 包含有醇溶蛋白,蛋白体 II 是由谷蛋白和球蛋白组成的<sup>[2]</sup>。大米  $\alpha$ -球蛋白是大米球蛋白的一种,它主要存在于大米蛋白体 II 中<sup>[3-4]</sup>。

虽然大米被认为是一种低致敏原食物,但是,基于对摄食大米产生过敏反应患者血清 IgE 抗体的免疫分析,鉴定出几种分子量为 60、33、26、14~16、9 ku 的大米蛋白质为致敏原<sup>[3-7]</sup>。其中分子量为 26 ku 的蛋白质被鉴定为大米  $\alpha$ -球蛋白,而且,大米  $\alpha$ -球蛋白是大米盐溶蛋白的主要组分<sup>[3]</sup>。转基因水稻是继转基因玉米、大豆、棉花和油菜之后最具开发潜力的转基因作物。被赋予抗病、抗虫、高产优质等性状的转基因水稻的研究开发已经在我国和其他国家展开<sup>[8-13]</sup>。致敏原表达水平的评价是转基因作物安全性评价的重要指标之一,包括  $\alpha$ -球蛋白在内的大米主要致敏原检测也是转基因大米安全性分析的重要内容之一<sup>[13-15]</sup>。

为了开发出对大米  $\alpha$ -球蛋白进行定性检测和定量分析的方法,本研究以大米  $\alpha$ -球蛋白基因的 cDNA 为模板进行了 PCR 扩增,并把扩增的目的片段亚克隆到表达质粒 pQE30 中,进而在大肠杆菌中进行大米  $\alpha$ -球蛋白的表达。以重组大米  $\alpha$ -球蛋白为抗原制作抗体,既可避免繁琐的蛋白质提取过程,也可以防止由于共存大米蛋白而引起的交叉免疫反应。随后,以重组  $\alpha$ -球蛋白为抗原免疫白兔制备了多克隆

抗体。本研究分析了该抗体的特异性,并利用此抗体建立了对大米  $\alpha$ -球蛋白进行定性和定量分析的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

编码大米  $\alpha$ -球蛋白的 cDNA 购自日本生物资源研究所; pQ30、Ni-NTA Superflow Cartridge、QIAGEN 质粒纯化试剂盒、QIAGEN PCR 产物纯化回收试剂盒和 QIAquick 凝胶提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; 蛋白酶抑制剂混合片 Complete Mini 和 PCR 试剂盒 Expand High Fidelity PCR System 购自德国罗氏公司; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III、去磷酸化试剂盒和 Mighty DNA 克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司; CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 购自美国贝克曼库尔特有限公司; Bezonase 核酸酶购自默克公司; Can Get Signal Solution 1 和 Can Get Signal Solution 2 购自东洋纺公司; Lysing Matrix D 购自日本船越公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG、Quick Start Bradford 蛋白质分析试剂盒、TMB 显色液(A、B 2 种)、PVDF 膜和 Precision Plus Protein Dual Color Standards 购自美国伯乐公司; ECL Prime Western Blotting System、HiTrap Protein A HP 购自 GE Healthcare 公司; Peroxidase Labeling Kit-NH2 购自日本同仁化学研究所; IMMUNO-TEK Construction System 购自 ZeptoMetrix 公司; 大米样品是从农户处购买的 3 种东北产糙米。

### 1.2 编码大米 $\alpha$ -球蛋白基因的亚克隆以及表达载体的构建

1.2.1 PCR 扩增目的片段 以编码大米  $\alpha$ -球蛋白基因的 cDNA 为模板,用 Expand High Fidelity PCR System 对编码大米  $\alpha$ -球蛋白的基因进行 PCR 扩增。用于扩增大米  $\alpha$ -球蛋白基因的正向引物是 5'-AAAGGATCCCTGACGAGTCG-GAGATGAGG-3', 其中用下划线标出的序列是 *Bam*H I 酶切位点; 反向引物是 5'-TTTAAGCTTCTACTACTAGTACTGGC-CGGC-3'; 其中用下划线标出的序列是 *Hind* III 酶切位点。

50  $\mu$ L PCR 反应体系: 5  $\times$  反应液 5  $\mu$ L、正向和反向引物

收稿日期: 2015-10-11

基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目(编号: BK20151286)。

作者简介: 郎刚华(1969—), 山东青岛人, 博士, 讲师, 主要从事食品致敏原及转基因食品安全性研究。E-mail: dichen123451@foxmail.com。

(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ 、模板 DNA 300 ng、dNTP 混合物(每种 dNTP 各 10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ 、Expand HiFi Enzyme Blend (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 补充 MilliQ 水至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 60 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

1.2.2 目的片段的回收和连接 PCR 产物先用 QIAGEN PCR 产物纯化回收试剂盒纯化, 再用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 最后用 QIAGEN PCR 产物纯化回收试剂盒纯化酶切产物。质粒 pQE30 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 切下含酶切载体片段的凝胶, 用 QIAquick 凝胶提取试剂盒纯化载体片段, 并用去磷酸化试剂盒进行去磷酸化。

1.2.3 重组质粒转化 用 Mighty DNA 克隆试剂盒将酶切后的 PCR 产物与酶切并去磷酸化的质粒载体片断进行连接, 然后将连接产物转化大肠杆菌 *E. coli* JM109。挑选青霉素抗性克隆进行液体培养过夜, 并用 QIAGEN 质粒纯化试剂盒纯化质粒。用限制性内切酶 *Bam*H I 酶切质粒后, 通过琼脂糖凝胶电泳比较酶切片段长度, 鉴定是否有插入子。

1.2.4 重组质粒测序 用 CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing Kit 对重组质粒的插入序列进行测序反应。采用 PQE30 的启动子区引物和反向测序引物分别进行正向和反向测序反应, 并用 Beckman - Coulter CEQ 2000 DNA 分析系统(贝克曼库尔有限公司)进行测序分析。

1.3 重组大米  $\alpha$ -球蛋白的表达及重组蛋白的金属亲和层析纯化

将经过测序确定的含有正确基因编码序列质粒的重组大肠杆菌进行小规模液体培养和诱导, 确认重组蛋白的诱导表达情况。将已经确认表达重组蛋白的克隆接种于含青霉素 50  $\mu\text{g/mL}$  的 LB 培养基中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内振荡培养过夜。次日, 用含青霉素 50  $\mu\text{g/mL}$  的 LB 培养基把过夜培养液稀释 50 倍, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱内振荡培养。当  $D_{600\text{nm}}$  达到 0.6 时, 添加 IPTG 至 1 mmol/L, 继续培养 4 h。4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 g 离心 20 min。将离心得到的大肠杆菌沉淀保存在 -80  $^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中。

按照 QIAGEN 公司的试剂盒使用说明, 用 Ni - NTA Superflow Cartridge 在变性条件下从大肠杆菌中对重组大米  $\alpha$ -球蛋白进行分离和纯化。随后, 向纯化得到的重组蛋白溶液中缓缓添加等体积的 TBS (20 mmol/L Tris - HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA, pH 值 8.0) 并混匀, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h 后, 用 Amicon<sup>®</sup> Ultra 超滤离心管 (10 ku, Millipore) 离心浓缩, 并将溶液浓缩到 TBS 添加前的体积; 然后再向蛋白质溶液中添加等体积的 TBS, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 2 h 后再进行离心浓缩; 如此重复进行溶液置换 8 次, 降低纯化的重组蛋白中的尿素浓度, 最后, 通过进一步离心浓缩, 使溶液中重组蛋白质的浓度达到 1 mg/mL 左右。

1.4 抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体的制备

准备 2 只新西兰白兔, 将重组  $\alpha$ -球蛋白溶液与弗氏完全佐剂充分混匀, 进行皮下多点注射, 初次免疫时每只白兔注射约 1 mg 的重组蛋白。初次免疫后每隔 2 周进行 1 次加强免疫, 共加强免疫 3 次。加强免疫时, 给每只白兔注射与弗氏不完全佐剂充分混匀的 0.5 mg 重组大米  $\alpha$ -球蛋白。最后

一次加强免疫 4 周后, 取兔全血, 并分离血清。

1.5 抗血清效价的 ELISA 测定

以含有重组大米  $\alpha$ -球蛋白 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 的包被液 100  $\mu\text{L}$ , 包被酶标板于 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日, 用 PBST 溶液 (0.01 mol/L PBS, pH 值 = 7.4, 0.1% Tween 20) 洗板 3 次, 每孔加入 3% 牛血清白蛋白 - PBS 溶液 200  $\mu\text{L}$ , 于 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 用 PBST 溶液洗板 3 次后, 加入 100  $\mu\text{L}$  不同稀释度的抗血清, 对照组用稀释相应倍数的阴性血清, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 再用 PBST 溶液洗板 3 次, 加入 100  $\mu\text{L}$  HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:6 000) 溶液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  保温 1 h, 用 PBST 溶液洗板 3 次后, 加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜配制的 TMB 显色液, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光反应 10 min, 加入 100  $\mu\text{L}$  1 mol/L 磷酸溶液, 并在 450 nm 下测定吸光度。

1.6 大米蛋白质的提取

将大米样品分别用实验室碾磨机 IFM - 800DG (日本岩谷株式会社) 碾磨成粉末, 称取 100 mg 米粉分别加入装有 Lysing Matrix D 的裂解管中, 加入含有 30 mmol/L Tris - HCl (pH 值 8.0)、1 mol/L NaCl 和 Complete Mini 的溶液 1 mL, 充分混匀后, 在冰水浴中放置 1 h。随后, 将裂解管放置在 Fast-Prep System FP100A (MP Biomedicals) 中, 在设置速度为 6.0 m/s 的条件下振荡提取 40 s。4  $^{\circ}\text{C}$ 、15 000 g 离心 10 min, 收集上清液, 分装后, 于 -80  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存。

1.7 蛋白质浓度的测定

以牛血清白蛋白为标准蛋白, 用 Quick Start Bradford Protein Assay Kit 对大米蛋白提取液中的蛋白质浓度进行测定。

1.8 用抗血清对大米  $\alpha$ -球蛋白进行 Western Blotting 检测

将提取的大米蛋白质用 SDS - PAGE (4% 浓缩胶, 15% 分离胶) 电泳分离后, 在 1  $\times$  转膜缓冲溶液 (25 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0, 200 mmol/L 甘氨酸, 20% 甲醇) 中用 Trans-Blot Semi - Dry Transfer Cell (伯乐公司) 将蛋白质条带从凝胶中转到 PVDF 膜上, 并用 5% 的脱脂奶粉 - TTBS (20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 7.5, 140 mmol/L NaCl, 体积分数 0.1% Tween 20) 溶液在 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 PVDF 膜过夜。次日, 将封闭的 PVDF 膜用 TBS (20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 7.5, 140 mmol/L NaCl) 漂洗 3 次后, 室温下与用 Can Get Signal Solution 1 稀释 12 000 倍的抗血清结合 1 h。再用 TTBS 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。随后, 室温下与用 Can Get Signal Solution 2 稀释 6 000 倍的 HRP 标记羊抗兔 IgG (H + L) 结合 1 h, 再用 TTBS 振荡洗涤 3 次, 每次 5 min。室温下与 ECL Prime 化学发光试剂反应 5 min, 用 ATTO 发光摄影装置 AE - 6981 检测化学发光信号。

1.9 大米  $\alpha$ -球蛋白的 Sandwich ELISA 检测

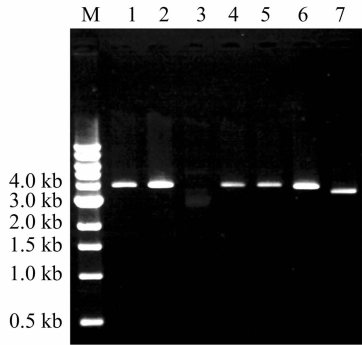
用 HiTrap Protein A HP 从抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗血清中纯化抗体。将用于检测的抗体用 Peroxidase Labeling Kit - NH<sub>2</sub> 进行辣根过氧化物酶标记。采用 IMMUNO - TEK Construction System, 用抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) 对酶标板进行包被, 并对酶标板进行封闭。Sandwich ELISA 检测前, 向每孔加 200  $\mu\text{L}$  PBS, 用封板膜封板后, 放置在 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。次日, 吸除 PBS, 加入用 PBS 稀释成一定浓度梯度的重组大米  $\alpha$ -球蛋白溶液或者待测大米蛋白质提取液, 并使每孔溶液体积为 100  $\mu\text{L}$ , 室温反应 1 h 后, 弃蛋白质溶液, 用 PBST 洗板 3 次, 加

入 100  $\mu\text{L}$  1 : 2000 稀释的辣根过氧化物酶标记抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体,室温反应 1 h。用 PBST 洗板 3 次后,加入 TMB (A : B = 9 : 1) 显色液 100  $\mu\text{L}$ ,室温避光反应 20 min 后,加入 100  $\mu\text{L}$  1 mol/L 磷酸溶液,并在 450 nm 测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 大米  $\alpha$ -球蛋白表达载体的构建

用 PCR 扩增的编码大米  $\alpha$ -球蛋白的 DNA 片段经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后,与双酶切并且脱磷酸化的质粒 pQE30 载体片段连接并转化大肠杆菌。从过夜培养的青霉素平板上挑取 6 个菌落,接种于含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素的 LB 培养基中,过夜培养后,纯化质粒,通过用 *Bam*H I 酶切质粒后进行琼脂糖凝胶电泳,初步确定质粒中有无插入子。从图 1 可以看出,在挑选的 6 个克隆中有 5 个克隆所含质粒的长度比载体质粒大,表明有插入序列,然后通过测序分析,发现在这 5 个质粒中的插入子都具有与编码大米  $\alpha$ -球蛋白基因相一致的序列并且以正确的方向插入到载体中。



M 为 1 kb DNA ladder; 泳道 1~6 为酶切后的重组质粒; 泳道 7 为酶切的载体质粒

图1 重组质粒中插入子的确认

在 *Bam*H I 酶切后的重组质粒中,有 5 个(泳道 1、2、4、5、6)质粒片段的长度大于酶切的载体质粒(泳道 7),表明这 5 个重组质粒中含有插入子。

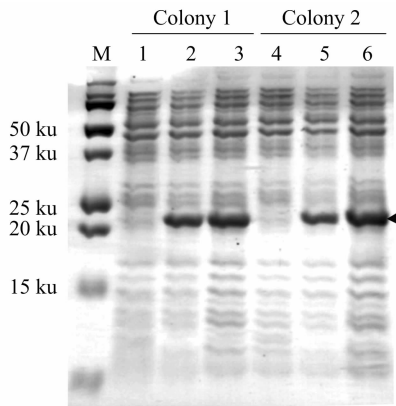
2.2 重组蛋白质的诱导表达及纯化

在用 IPTG 诱导 2 h 后,重组大米  $\alpha$ -球蛋白在来自 2 个重组大肠杆菌菌落的菌体中均已有了显著的表达(图 2),为了获得更多的重组蛋白,在用 IPTG 诱导 4 h 后进行菌体收集。在变性的条件下,用 Ni-NTA Superflow Cartridge 对重组蛋白进行了纯化,因为重组大米  $\alpha$ -球蛋白的表达水平较高,而且与金属亲和层析凝胶有较强的结合力,所以,在 pH 值 = 4.5 的洗脱液中,重组大米  $\alpha$ -球蛋白被纯化为主要蛋白质组分(图 3)。随后,通过溶液置换和离心浓缩,使重组蛋白质溶液中尿素的浓度降低至 0.03 mol/L。虽然在溶液置换过程中,有部分的重组蛋白沉淀出来,但是,仍然回收到了可溶性的重组蛋白组分。

在 IPTG 诱导后,重组大米  $\alpha$ -球蛋白在挑选的 2 个克隆(Colony 1 和 Colony 2)中进行了显著表达。在 IPTG 诱导前,重组大米  $\alpha$ -球蛋白无明显表达;当 IPTG 诱导 2 h 和 4 h 时,重组大米  $\alpha$ -球蛋白均有显著表达。

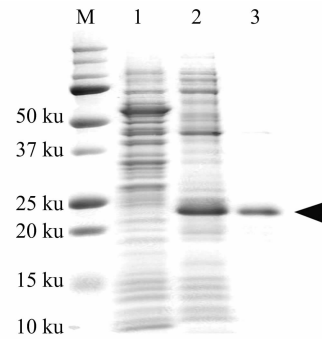
2.3 抗血清效价的 ELISA 检测

抗血清效价的 ELISA 检测结果见表 1 和表 2。免疫前



M 为 Precision Plus Protein Dual Color Standards; 泳道 1 和 4 为 IPTG 诱导前、泳道 2 和 5 为 IPTG 诱导 2 h 时、泳道 3 和 6 为 IPTG 诱导 4 h 时重组大米  $\alpha$ -球蛋白的诱导表达; 箭头指示重组大米  $\alpha$ -球蛋白的对应蛋白质条带

图2 大肠杆菌中重组大米  $\alpha$ -球蛋白的诱导表达



M 为 Precision Plus Protein Dual Color Standards; 泳道 1 为 IPTG 诱导前的重组大肠杆菌提取物; 泳道 2 为 IPTG 诱导 4 h 时表达  $\alpha$ -球蛋白的菌体提取物; 泳道 3 为用 pH 值 = 4.5 的洗脱液从 Ni-NTA Superflow Cartridge 中洗脱下的重组大米  $\alpha$ -球蛋白; 箭头指示重组  $\alpha$ -球蛋白的对应蛋白质条带

图3 重组大米  $\alpha$ -球蛋白的纯化

(0 周), 2 只白兔血清的免疫反应都非常低,而且 1 号白兔血清的免疫反应较 2 号白兔血清更低。免疫进行到 4 周和 6 周时,2 只白兔抗血清的抗体滴度均较前次采样样品有显著的提高。免疫进行到 7 周时,2 号白兔血清抗体滴度较 6 周时无明显变化;而 1 号白兔血清抗体滴度较 6 周时又略有升高,最后,2 只白兔血清的抗体滴度均高于 1 : (1.25  $\times$  10<sup>5</sup>)。ELISA 检测结果显示,2 只白兔抗血清中的抗体对抗原都具有较强的免疫结合活性。因为 1 号白兔血清的抗体滴度略高于 2 号白兔血清的抗体滴度,所以,在后续的研究中,主要利用 1 号白兔血清的抗体进行了检测方法的建立和检测分析。

表 1 1 号白兔抗血清效价的 ELISA 检测

| 免疫时间<br>(周) | 不同稀释倍抗血清的 $D_{450\text{ nm}}$ 值 |                            |                              |                               |
|-------------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|             | 1 $\times$ 10 <sup>3</sup>      | 5 $\times$ 10 <sup>3</sup> | 2.5 $\times$ 10 <sup>4</sup> | 1.25 $\times$ 10 <sup>5</sup> |
| 0           | 0.005                           |                            |                              |                               |
| 4           | 1.812                           | 1.042                      | 0.406                        | 0.127                         |
| 6           | 2.546                           | 1.728                      | 0.974                        | 0.351                         |
| 7           | 2.628                           | 1.994                      | 1.187                        | 0.531                         |

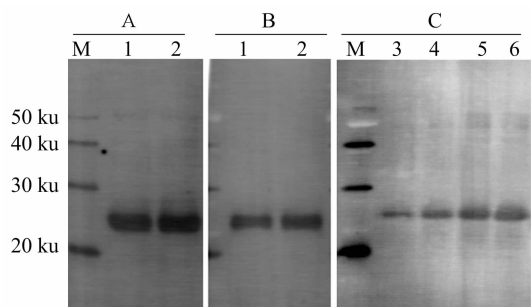
2.4 大米  $\alpha$ -球蛋白的 Western Blotting 检测

Western Blotting 结果(图 4 - A、图 4 - B)显示,2 只白兔

表 2 2 号白兔抗血清效价的 ELISA 检测

| 免疫时间<br>(周) | 不同稀释倍抗血清的 $D_{450\text{ nm}}$ 值 |                 |                   |                    |
|-------------|---------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
|             | $1 \times 10^3$                 | $5 \times 10^3$ | $2.5 \times 10^4$ | $1.25 \times 10^5$ |
| 0           | 0.038                           | 0.010           |                   |                    |
| 4           | 1.815                           | 1.040           | 0.398             | 0.100              |
| 6           | 2.246                           | 1.452           | 0.684             | 0.239              |
| 7           | 2.245                           | 1.484           | 0.725             | 0.248              |

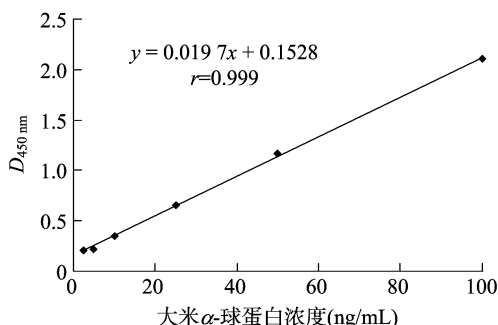
的抗血清均与大米蛋白质中分子量为 26 ku 的蛋白质发生了特异性的免疫结合反应,分子量 26 ku 正是所报道的大米  $\alpha$ -球蛋白的分子量<sup>[16-17]</sup>,所以,以重组大米  $\alpha$ -球蛋白免疫白兔制备的抗血清可以特异性地识别并结合大米  $\alpha$ -球蛋白。而且,随着大米蛋白质上样量的提高,检测信号逐渐增强(图 4-C)。因此,抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体与目标蛋白的结合呈现一定的定量关系,表明此抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体不仅可用于大米  $\alpha$ -球蛋白的定性检测,而且可用于目标蛋白质的定量分析。



M 为 MagicMark XP western protein standard; A、B 分别为白兔 1 和白兔 2 的抗血清;电泳泳道 1 和 2 内大米蛋白质的上样量分别为 1  $\mu\text{g}$  和 2  $\mu\text{g}$ ;电泳泳道 3~6,大米蛋白质的上样量分别为 0.05、0.1、0.2、0.4  $\mu\text{g}$ ;箭头指示大米  $\alpha$ -球蛋白的信号

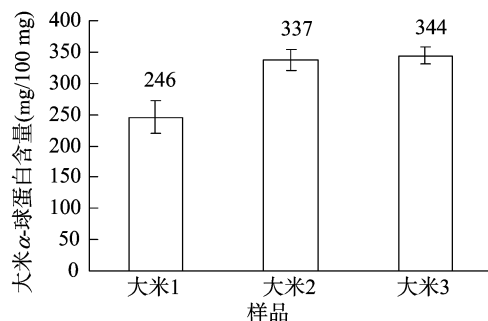
## 2.5 大米 $\alpha$ -球蛋白的 Sandwich ELISA 检测

利用从抗血清中纯化的抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体,采用 IMMUNO-TEK Construction System 构建了大米  $\alpha$ -球蛋白的 Sandwich ELISA 检测体系。以重组蛋白质的浓度为横坐标,以在波长 450 nm 处的吸光度为纵坐标,所得标准曲线如图 5 所示。标准曲线的回归方程为  $y = 0.0197x + 0.1528$ ,检出限为 0.526 ng/mL,在线性范围为 2.5 ~ 100 ng/mL 的范围内,大米  $\alpha$ -球蛋白标准曲线的相关系数为 0.999,因此,具有较好的线性关系,从而保证了定量的准确性。

图 5 大米  $\alpha$ -球蛋白的 Sandwich ELISA 标准曲线

利用此 Sandwich ELISA 检测体系,对 3 种大米样品中的  $\alpha$ -球蛋白含量进行了测定,3 种大米的  $\alpha$ -球蛋白含量见图

6。结果表明,3 种大米样品中,3 号米中  $\alpha$ -球蛋白的含量最高,2 号米中  $\alpha$ -球蛋白的含量次之,1 号米中  $\alpha$ -球蛋白的含量最低。所以,此 Sandwich ELISA 检测体系可应用于比较大米样品之间  $\alpha$ -球蛋白的含量,以及用于比较转基因大米与其宿主大米品种之间  $\alpha$ -球蛋白的表达水平。

图 6 大米样品中  $\alpha$ -球蛋白的含量检测

## 3 结论

以 pQE30 为表达载体,在大肠杆菌 *E. coli* JM109 中实现了大米  $\alpha$ -球蛋白的高效诱导表达。以重组大米  $\alpha$ -球蛋白为抗原免疫白兔制备出了抗大米  $\alpha$ -球蛋白的多克隆抗体。利用此抗体对大米中的  $\alpha$ -球蛋白进行了 Western Blotting 检测,该抗体能够特异性地与大米  $\alpha$ -球蛋白进行结合反应,而且,抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体与大米  $\alpha$ -球蛋白的结合呈现一定的定量关系。另外,利用此抗体构建了大米  $\alpha$ -球蛋白的 Sandwich ELISA 检测体系,并利用此检测体系测定出了 3 种大米样品中  $\alpha$ -球蛋白的含量。因此,利用抗大米  $\alpha$ -球蛋白抗体建立起的 Western Blotting 和 Sandwich ELISA 检测方法可以应用于大米  $\alpha$ -球蛋白的定性检测和大米样品间  $\alpha$ -球蛋白含量的比较分析。

## 参考文献:

- [1] Tanaka K, Sugimoto T, Ogawa, et al. Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1980, 44: 1633 - 1639.
- [2] Kubota M, Saito Y, Masumura T, et al. *In vivo* digestibility of rice prolamins/protein body - I particles decreased by cooking[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2014, 60(4): 300 - 304.
- [3] Lee H J, Jo Y M, Lee J Y, et al. Lack of globulin synthesis during seed development alters accumulation of seed storage proteins in rice[J]. International Journal of Molecular Science, 2015, 16(7): 14717 - 14736.
- [4] Nakase M, Izaki K, Hidaka I. Reduction of rice proteins based on their solubility and evaluation of the low-protein rice products[J]. Bulletin Minamikyushu University, 2012, 42A: 15 - 20.
- [5] Usui Y, Nakase M, Hotta H, et al. A 33 - kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. japonica). cDNA cloning, expression, and identification as a novel glyoxalase I[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276: 11376 - 11381.
- [6] Urisu A, Yamada K, Masuda S, et al. 16 - kilodalton rice protein is one of the major allergens in rice grain extract and responsible for cross-allergenicity between cereal grains in the Poaceae family[J]. International archives of allergy and immunology, 1991, 96: 244 - 252.

(下转第 113 页)

表 2 不同处理棉株的  $K^+$ 、 $Na^+$  含量和比值

| 生育时期     | 处理 | $K^+$ 含量 (mg/g) |        | $Na^+$ 含量 (mg/g) |        | $K^+ / Na^+$ |         |
|----------|----|-----------------|--------|------------------|--------|--------------|---------|
|          |    | 营养器官            | 生殖器官   | 营养器官             | 生殖器官   | 营养器官         | 生殖器官    |
| 8 月 31 日 | S1 | 25.57b          | 24.66a | 3.62ab           | 1.99b  | 7.08bc       | 12.45ab |
|          | S2 | 25.39b          | 23.61a | 3.82ab           | 2.10ab | 6.64c        | 11.27ab |
|          | S3 | 27.85a          | 26.86a | 3.58ab           | 1.97b  | 7.78ab       | 13.63a  |
|          | S4 | 27.65a          | 26.46a | 3.48b            | 1.90b  | 7.99a        | 13.93a  |
|          | S5 | 25.65b          | 24.43a | 3.74ab           | 2.35ab | 6.86c        | 10.47ab |
|          | CK | 23.15c          | 22.10a | 3.99a            | 2.55a  | 5.81d        | 8.81b   |
| 9 月 20 日 | S1 | 25.40ab         | 23.40a | 4.58ab           | 1.86b  | 5.59bc       | 12.64a  |
|          | S2 | 25.45a          | 23.00a | 4.06abc          | 2.08ab | 6.29ab       | 11.10ab |
|          | S3 | 24.01bc         | 22.81a | 3.97bc           | 1.78b  | 6.06ab       | 12.86a  |
|          | S4 | 26.82a          | 20.66a | 3.84c            | 1.67b  | 6.98a        | 12.40a  |
|          | S5 | 23.74cd         | 20.92a | 4.12abc          | 1.86b  | 5.76abc      | 11.27ab |
|          | CK | 22.50d          | 18.99a | 4.75a            | 2.45a  | 4.74c        | 7.83b   |

研究表明,高垄、覆膜和喷湿土壤改良剂等种植方式可明显提高棉花叶绿素含量,降低可溶性糖含量,同时提高  $K^+$  含量,降低  $Na^+$  含量。尤其是喷湿改良剂 + 覆膜和喷湿改良剂 + 高垄覆膜 2 个处理各个时期叶绿素含量和  $K^+ / Na^+$  都高于对照,可溶性糖含量低于对照。显然高垄、覆膜和喷湿改良剂等种植方式降低了土壤盐分,更有利于棉花生长发育。

#### 参考文献:

- [1] 刘友兆,吴春林,马欣. 江苏滩涂资源开发利用研究[J]. 中国农业资源与区别,2004,25(3):6-9.
- [2] 辛承松,董合忠,唐薇,等. 棉花盐害与耐盐性的生理和分子机理研究进展[J]. 棉花学报,2005,17(5):309-313.
- [3] 中国农业科学院棉花研究所. 中国棉花栽培学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983:172-174.
- [4] 曹福亮. 中国南方主要造林树种耐盐耐旱机理研究[M]. 北京:中国林业出版社,1999.
- [5] 吴水波,薛建辉. 盐胁迫对 3 种白蜡幼苗生长与光合作用的影响[J]. 南京林业大学学报,2002,26(3):19-22.
- [6] 李姝睿. 盐胁迫对芸豆体内可溶性糖含量的影响[J]. 青海师范

大学学报:自然科学版,2003(2):65-66.

- [7] 周俊国,朱月林,杨立飞,等. NaCl 胁迫下中国南瓜杂交种和黑籽南瓜植株离子吸收与积累特性研究[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(3):546-551.
- [8] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000:72-75,111.
- [9] 代建龙,董合忠,段留生. 棉花盐害的控制技术及其机理[J]. 棉花学报,2010,22(5):486-494.
- [10] 韩勇,许映飞,顾超,等. 不同种植方式对盐碱地棉花干物质质量及氮磷钾积累的影响[J]. 棉花学报,2014,26(2):184-188.
- [11] 过晓明,张楠,马代夫,等. 盐胁迫对 5 种甘薯幼苗叶片叶绿素含量和细胞膜透性的影响[J]. 江苏农业科学,2010(3):93-94.
- [12] 张海燕,赵可夫. 盐分和水势胁迫对盐地碱蓬幼苗渗透调节效应的研究[J]. 植物学报,1998,40(1):56-61.
- [13] 方志红,董宽虎. NaCl 胁迫对碱蒿可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响[J]. 中国农学通报,2010,26(16):147-149.
- [14] 王素平,郭世荣,胡晓辉,等. NaCl 胁迫对黄瓜幼苗体内  $K^+$ 、 $Na^+$  和  $Cl^-$  分布的影响[J]. 生态学杂志,2007,26(3):348-354.

(上接第 37 页)

- [7] Enrique E, Ahrazem O, Bartra J, et al. Lipid transfer protein is involved in rhinoconjunctivitis and asthma produced by rice inhalation[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, 116: 926-928.
- [8] 邓力华,邓晓湘,魏岁军,等. 抗虫抗除草剂转基因水稻 B1C893 的获得与鉴定[J]. 杂交水稻,2014,29(1):67-71.
- [9] 熊燕,陈大明,王斌,等. 转基因农作物商业化种植情况与挑战[J]. 生物产业技术,2009,2:10-16.
- [10] 谭远军,高瞻,陈丽丽. 转基因作物与安全性[J]. 黑龙江农业科学,2013(1):101-103.
- [11] Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, et al. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011, 50(3): 437-444.
- [12] 王宁. 基于文献的我国转基因水稻研究发展态势分析[J]. 北方水稻,2014,44(6):5-6,11.

- [13] Satoh R, Nakamura R, Komatsu A, et al. Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2011, 59: 437-444.
- [14] Takagi H, Saito S, Yang L, et al. Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine[J]. Plant Biotechnology Journal, 2005, 3: 521-533.
- [15] Wakasa Y, Takagi H, Watanabe N, et al. Concentrated protein body product derived from rice endosperm as an oral tolerogen for allergen-specific immunotherapy - a new mucosal vaccine formulation against Japanese cedar pollen allergy[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120209.
- [16] Komatsu S, Hirano H. Rice seed globulin: a protein similar to wheat seed glutelin[J]. Phytochemistry, 1992, 31: 3455-3459.
- [17] Pan S J, Reeck G R. Isolation and characterization of rice  $\alpha$ -globulin[J]. Cereal chemistry, 1988, 65: 316-319.