

Bt 棉棉子中 Bt 蛋白定量检测方法建立及变化规律研究

徐宝梁^{1,2}, 苏宁², 袁飞¹, 王因霞¹, 陈颖², 吴亚君², 张青文^{1*}

(1. 中国农业大学, 北京 100061; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要:应用 Enviroligix 试剂盒测定 99B、33B 棉子仁中 Bt 蛋白的含量, 分别为 $4376.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $4321.7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$; 测定系列稀释的棉子仁提取液, Enviroligix 试剂盒测得的 OD_{450} 和 Agdia 试剂盒测得的 OD_{630} 间的相关性很好, 相关系数接近 0.99; 而 Agdia 试剂盒测得的系列稀释液的 OD_{630} 与其 Bt 蛋白含量间有很好的相关性, 相关系数大于 0.99。据此, 利用 Agdia 试剂盒测得 99B、33B 棉子、棉子仁、棉子壳在 12 个月的贮存过程中 Bt 蛋白含量的变化规律, 棉子、棉子仁中 Bt 蛋白含量降低一半, 棉子壳中 Bt 蛋白含量降低四分之一。

关键词: Bt 棉棉子; Bt 蛋白含量; 变化规律

中图分类号: S433.1 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2006)01-0019-04

Study on the Quantitative Method and the Degradation Rule of Bt protein in Bt Cottonseeds

XU Bao-liang^{1,2}, SU Ning², YUAN Fei², WANG Yin-xia¹, CHEN Ying², WU Ya-jun², ZHANG Qing-wen^{1*}

(1. *China Agricultural University, Beijing 100061, China*; 2. *Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China*)

Abstract: Cottonseeds, cottonseed kernels and cottonseed shells of 99B and 33B were stored in a dry and dark place at room temperature. Samples were taken every month and grounded. Extractions of cottonseeds, kernels and shells were prepared using the method described in the instructions of the kits. The extractions were serially diluted with the extraction buffers at the ratio of 1 : 1 (volume to volume). Bt protein contents of cottonseed kernels were determined using Enviroligix kit followed the instruction of the kit. Optical densities of the extraction and the diluted extractions from cottonseeds, kernels and shells at 450 nm and 630 nm were determined using Enviroligix kit and Agdia kit respectively followed the instructions of the kits.

The Bt protein contents in 99B and 33B cottonseed kernels were $4376.4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ and $4321.7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. The OD_{450} of series of dilutions of the cottonseed kernel extracts measured using the Enviroligix kit was linearly correlated with the OD_{630} detected using Agdia kit, and the correlation coefficient was almost 0.99. Furthermore, the OD_{630} of the dilutions was also linearly correlative with the contents of Bt protein, and the correlation coefficient was larger than 0.99. Thus the degradation rule of Bt protein in 99B and 33B cottonseeds, kernels and shells in the process of 12 months storage were determined using Agdia kit, and the Bt protein contents in the cottonseeds and kernels were half after the storage, while the contents in the shells were one fourth, both in 99B and 33B.

Enviroligix kit with Bt protein reference standards could be used to determine the Bt protein quantitatively. Agdia kit with high sensitivity was able to detect the Bt protein in cottonseed, kernels and shells qualitatively. The quantitative method with high sensitivity for the determination of Bt protein was established in this study based on the characteristics of Enviroligix kit and Agdia kit, and the

degradation rules of Bt protein in 99B and 33B cottonseeds, kernels and shells in the process of storage were described in Bt amounts. The contents of Bt protein in cottonseed shells decreased rapidly in the process of storage, and the contents of Bt protein in cottonseeds and kernels decreased more rapidly in the storage. When cottonseeds, kernels and shells were used as materials in the study related to the Bt protein, the degradation of Bt protein in the storage process of those materials should be taken into account. When the Bt protein contents in cottonseeds and kernels were determined using Enviroligix kit and Agdia kit, the Bt protein contents were not linearly correlated with net optical density at low diluted times, but were linearly correlated with the net optical density at high diluted times. As such, for the determination of Bt protein the extractions of cottonseeds and kernels should be diluted until the Bt protein concentrations were linearly correlated with the net optical density measured using the kits. The extraction should be diluted about 100 times, and thus the Bt protein contents measured using the kits were real, otherwise the content of Bt protein in cottonseeds and kernels determined using the kits would be lower than that normal.

Key words: Bt cottonseed; Bt protein content; degradation rule

转基因棉花是我国目前唯一大规模种植的转基因作物,占棉花总种植面积的50%以上^[1]。已有文献报道应用生物学和免疫学测定方法,对棉花植株各器官中Bt蛋白的含量进行测定,测得不同时期的植株、不同时期和不同部位的叶子、棉铃、棉子中Bt蛋白的含量^[2-5],确定了转基因棉花植株中Bt蛋白的时空分布。有关转Bt基因棉花的研究中,棉子是一个非常重要的研究材料^[6-8],但至今未见棉子贮存过程中Bt蛋白含量变化规律的研究报道。结合Bt蛋白测定定量、定性ELISA试剂盒的特点,建立了灵敏的Bt蛋白测定定量方法,据此研究了DP99B、新棉33B棉子、棉子仁、棉子壳中Bt蛋白含量的变化规律。

1 材料和方法

1.1 棉子、棉子仁、棉子壳贮存

DP99B(以下简称99B,孟山都北京办事处)和新棉33B(以下简称33B,孟山都北京办事处)棉子、棉子仁、棉子壳于室温、干燥、避光贮存,每月取样测定。

1.2 棉子、棉子仁提取液与稀释液配制

样品磨碎;利用试剂盒提供的提取缓冲液,按照试剂盒提供的方法,得到棉子、棉子仁、棉子壳提取液;用试剂盒提供的提取缓冲液连续2倍稀释上清液,得到稀释液。

1.3 ELISA测定

根据Enviroligix试剂盒(Quantiplate Kit for Cry1Ab/Cry1Ac,半定量测定用,USA)说明书测定,450 nm处,在酶标仪(MK3,Thermolabsystem)上读取OD₄₅₀值;根据Agdia试剂盒(Bt-Cry1Ab/Cry1Ac ELISA Kit,定性测定用,USA)说明书测

定,630 nm处,在酶标仪上读取OD₆₃₀值。

2 结果与分析

2.1 Enviroligix试剂盒测定棉子仁中Bt蛋白含量

表1是测定99B棉子仁中Bt蛋白含量时Enviroligix试剂盒所得数据,据此得标准曲线为 $y = 9.4607x - 3.5979$, $R^2 = 0.964$;表2是测定33B棉子仁中Bt蛋白含量时Enviroligix试剂盒所得数据,据此得标准曲线为 $y = 35.8423x - 3.7563$, $R^2 = 0.9935$ 。

表1 Enviroligix试剂盒测定数据1

Table 1 Data of Enviroligix kit 1

标准品浓度/(ng·mL ⁻¹)	CK	1.5	10	25
平均OD ₄₅₀ 值	0.137	0.499	1.851	3.059
净OD ₄₅₀ 值		0.362	1.714	2.922

表2 Enviroligix试剂盒测定数据2

Table 2 Data of Enviroligix kit 2

标准品浓度/(ng·mL ⁻¹)	CK	1.5	10	25
平均OD ₄₅₀ 值	0.109	0.236	0.523	0.899
净OD ₄₅₀ 值		0.127	0.414	0.79

99B、33B棉子仁提取液按2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096倍稀释。用Enviroligix试剂盒测定原液、每个稀释度的OD₄₅₀,扣除对照(不加棉子仁提取液)OD₄₅₀,即为净吸光值。对稀释倍数的倒数(x值)和净吸光值(y值)两组数据进行回归分析,对于99B棉子仁提取液,只有256、512、1024、2048倍稀释液,两组数据(表3)成线性关系, $y = 154.63x - 0.0403$, $R^2 = 0.9984$;对于33B棉子仁提取液,只有128、256、512、1024、2048、4096倍稀释液,两组数据(表3)成线性关系, $y = 25.253x +$

0.01, $R^2 = 0.9821$ 。

表 3 99B、33B 棉子仁中 Bt 蛋白含量
Table 3 Bt protein contents in 99B and 33B
cottonseed kernels

稀释倍数	99B		33B	
	净吸光值	棉子仁中 Bt 蛋白含量 / (ng · g ⁻¹)	净吸光值	棉子仁中 Bt 蛋白含量 / (ng · g ⁻¹)
128 ×	/	/	0.199	4321.7
256 ×	0.561	4376.4	0.125	1853.4
512 ×	0.277		0.059	
1024 ×	0.102		0.041	
2048 ×	0.043		0.014	
4096 ×	/		0.010	

将表 3 的净吸光值代入相应的 Envirologix 试剂盒标准曲线中, 99B 棉子仁中 Bt 蛋白含量为 4376.4 ng · g⁻¹; 33B 棉子仁中 Bt 蛋白含量为 4321.7 ng · g⁻¹, 256 倍稀释液中 Bt 蛋白含量已接近 Envirologix 试剂盒标准曲线的低限, 没有实际意义。

2.2 Envirologix 试剂盒和 Agdia 试剂盒测得的净吸光值的线性关系

用 Envirologix 试剂盒测定 99B 和 33B 棉子仁提取液原液、2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2048、4096 倍稀释液的 OD₄₅₀, 扣除对照(不加棉子仁提取液)OD₄₅₀, 即为净吸光值(y 值); 用 Agdia 试剂盒测定 99B 和 33B 棉子仁提取液原液、上述稀释液的 OD₆₃₀, 扣除对照(不加棉子仁提取液)OD₆₃₀, 即为净吸光值(x 值)。对两组净吸光值进行回归分析, 99B 棉子仁稀释液从 8 倍开始到 2048 倍, 两试剂盒所得的净吸光值间线性关系为 $y = 1.568x - 0.0526$, $R^2 = 0.9986$; 33B 棉子仁稀释液从 16 倍开始到 4096 倍, 两试剂盒测得的净吸光值间线性关系为 $y = 0.4383x - 0.0113$, $R^2 = 0.987$ 。

2.3 Agdia 试剂盒测得的净吸光值与 Bt 蛋白浓度的线性关系

对 99B 棉子仁不同稀释提取液的 Bt 蛋白浓

表 4 稀释液 Bt 蛋白浓度和 Agdia 试剂盒测得的净吸光值
Table 4 Bt protein concentration of the dilution and its net optical density by Agdia kits

稀释倍数	99B 棉子仁		33B 棉子仁	
	Bt 蛋白浓度 / (ng · g ⁻¹)	净吸光值	Bt 蛋白浓度 / (ng · g ⁻¹)	净吸光值
128 ×	34.2	0.618	33.8	0.543
256 ×	17.1	0.360	16.9	0.303
512 ×	8.5	0.199	8.5	0.133
1024 ×	4.3	0.102	4.2	0.066
2048 ×	2.2	0.061	2.1	0.032
4096 ×	1.1	0.028	1.0	0.012

度(y 值)和净吸光值(x 值)两组数据进行回归分析, 只有 128、256、512、1024、2048、4096 倍稀释液中, 两组数据(表 4)成线性关系, $y = 56.4972x - 1.6271$, $R^2 = 0.9924$; 对 33B 棉子仁不同稀释提取液的 Bt 蛋白浓度(y 值)和净吸光值(x 值)两组数据进行回归分析, 只有 128、256、512、1024、2048、4096 倍稀释液中, 两组数据(表 4)成线性关系, $y = 60.9756x + 0.0122$, $R^2 = 0.9959$ 。

2.4 棉子、棉子仁、棉子壳贮存过程中 Bt 蛋白变化规律

根据上述线性关系, 测得 99B 和 33B 棉子、棉子仁、棉子壳中 Bt 蛋白变化规律如图 1 中 A、B、C、D。经过 12 个月的贮存, 棉子、棉子仁中 Bt 蛋白的含量降低一半左右, 而棉子壳中 Bt 蛋白降低了四分之一左右。

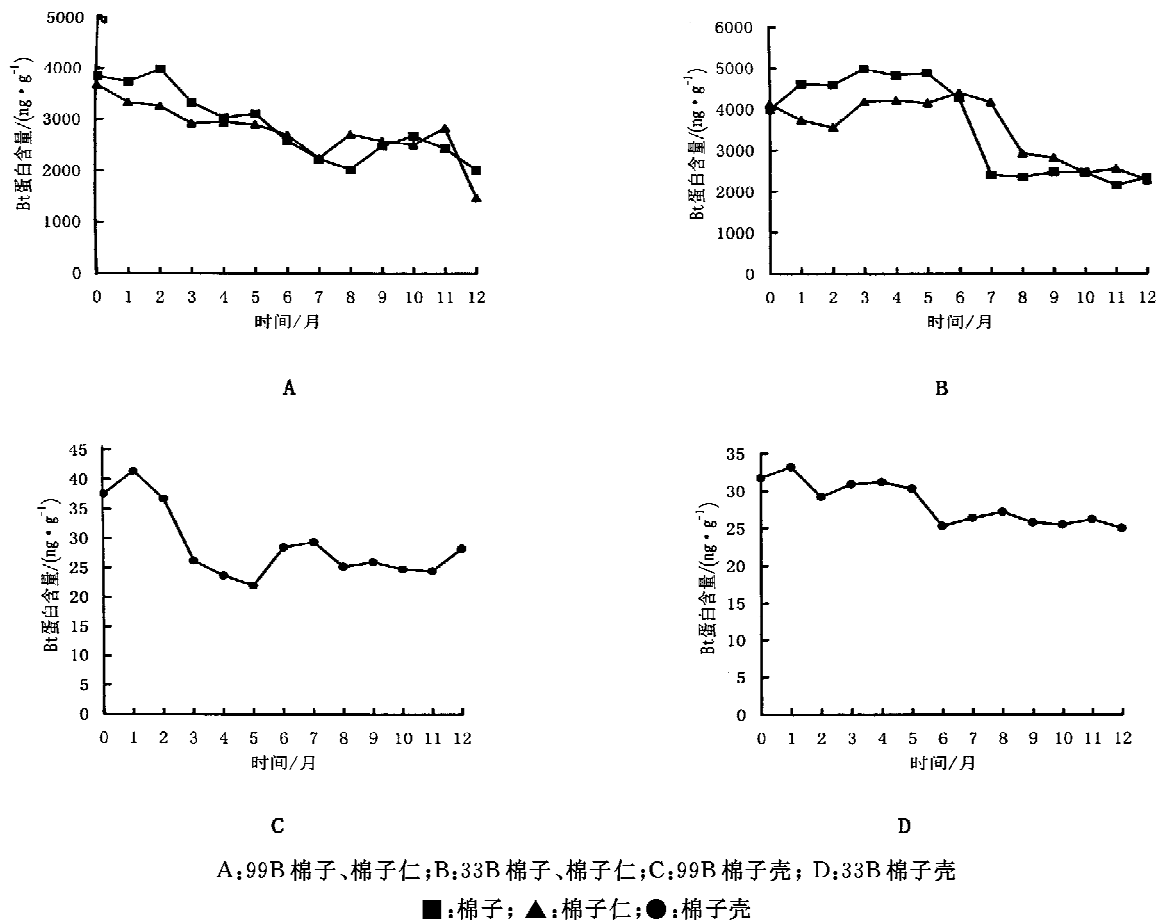
3 讨论

为了测定某些棉花组织(如棉子壳)、加入棉花组织的某些试验材料(如用 Bt 棉棉子配制的培养平菇的培养料)中 Bt 蛋白的含量, 本实验室对国内外多种试剂盒进行了试用^[9], 希望得到一种灵敏度高的定量 ELISA 试剂盒, 用于上述情况下 Bt 蛋白的含量测定。Envirologix 试剂盒是半定量试剂盒, 配备 3 个浓度的标准参考物, 可以进行半定量测定; Agdia 试剂盒是定性试剂盒, 灵敏度较高, 可以满足于上述条件下 Bt 蛋白的测定。本研究中, 充分利用了这两种试剂盒的特点, 建立了灵敏度较高的、用于 Bt 蛋白测定的定量方法。

棉子、棉子仁在贮存过程中, Bt 蛋白的含量下降得很快, 经过一年的贮存, Bt 蛋白的含量降低一半左右。棉子壳中的 Bt 蛋白的含量下降得慢一些, 经过一年的贮存, 下降四分之一左右。在以 Bt 棉为材料开展和 Bt 蛋白有关的研究工作时, 要特别注意棉花材料贮存过程中 Bt 蛋白的降解, 以免实验室间、前后实验间数据有差异。

利用这两种试剂盒测定棉子、棉子仁中 Bt 蛋白的含量时, 在低浓度时, Bt 蛋白的含量和净吸光值间成线性关系; 而在高浓度情况下, 则没有线性关系。利用其它试剂盒、或测定其它作物的 Bt 蛋白含量时, 是否也存在类似情况, 有待进一步探索。因此, 在测定棉子、棉子仁中 Bt 蛋白含量时, 一定要进行稀释测定, 使 Bt 蛋白的含量和净吸光值进入线性关系后, 才能得到一个稳定的、符合实际情况的实验数据, 否则 Bt 蛋白的含量偏低; 稀

释倍数要大于100倍。



A:99B 棉子、棉子仁;B:33B 棉子、棉子仁;C:99B 棉子壳; D:33B 棉子壳

■:棉子; ▲:棉子仁; ●:棉子壳

图1 棉子、棉子仁、棉子壳贮存过程中 Bt 蛋白变化规律

Fig.1 The degradation rule of Bt protein in cottonseeds, kernels and shells in the process of storage

Enviroligix 试剂盒是半定量试剂盒,在测定 99B 棉子仁中 Bt 蛋白含量时,经过多次重复,标准曲线的相关系数也只能达到 0.9639;而在测定 33B 棉子仁中 Bt 蛋白含量时,标准曲线的相关系数达到了 0.99,且线性范围有所扩大,但测得的吸光值降低;两批产品间,试剂盒性能有所波动,但 33B 棉子仁中 Bt 蛋白含量前后两次定值基本一致。Agdia 试剂盒灵敏度较高,稳定性较好。Enviroligix 试剂盒和 Agdia 试剂盒的配合使用,直观地测定了 99B 和 33B 棉子、棉子仁、棉子壳贮存过程中,Bt 蛋白的变化规律。

参考文献:

- [1] 宋天俊, 吴洪兴, 刘景珍. 转基因抗虫棉发展现状及产业化[J]. 农业科技通讯, 2004, 9: 34-35.
- [2] 崔金杰, 夏敬源. 转 Bt 基因棉对棉铃虫抗性的时空动态[J]. 棉花学报, 1999, 11(3): 141-146.
- [3] 张小四, 李松岗, 许崇仁, 等. 转 Bt 棉不同生育期与

不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2000, 36: 477-484.

- [4] 赵奎军, 赵建周, 范贤林, 等. 我国转 Bt 抗虫基因杀虫活性的时间与空间动态分布[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8: 49-52.
- [5] 王保民, 李召虎, 李 斌, 等. 转 Bt 抗虫棉各器官毒蛋白的含量及表达[J]. 农业生物技术学报, 2002, 3: 215-219.
- [6] 李 谷, 陈 松, 游文章, 等. 转 Bt 基因棉棉仁粉对鲤鱼毒性效应的评估[J]. 水产科学, 2000, 19(6): 8-11.
- [7] 徐宝梁, 贾建会, 王因霞, 等. 培养料中棉子成分对平菇生长的影响[J]. 中国食用菌, 2004, 23(3): 29-31, 35.
- [8] 张 宁, 陈明南, 马继霞, 等. 转 Cry1A(c)基因抗虫棉花棉籽的诱变活性研究[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(3): 217-221.
- [9] 徐宝梁, 苏 宁, 陈 颖, 等. 转基因棉子壳中 Bt 蛋白含量测定方法研究[J]. 中国棉花, 2004, 31(2): 12-14.