

湖南省农业技术规程

HNZ093-2015

转Bt基因抗虫棉花外源蛋白表达量检测技术规程

Technical regulations for determining exogenous protein content
in Bt transgenic cotton

湖南省农业农村厅发布

发布日期：2015年12月31日

转 Bt 基因抗虫棉花外源蛋白表达量检测技术规程

为规范田间条件下抗虫转 *Bt* 基因棉花不同生育期组织和器官中外源 *Bt* 杀虫蛋白表达的 ELISA 定量检测，制定本规程。请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

1 原理

在适宜生态区田间条件下种植受检棉花试验材料，分别抽取苗期、蕾期、铃期等关键生育期的棉花叶片、蕾、铃，采用酶联免疫方法（ELISA）检测外源 *Bt* 杀虫蛋白的表达量，判断受检棉花材料外源 *Bt* 杀虫蛋白表达水平。

2 仪器和设备

2.1 分析天平：感量 0.01g。

2.2 酶标仪

2.3 洗板机

2.4 超低温冰箱

2.5 冷冻离心机

2.6 其它相关仪器

3 要求

3.1 试验材料

3.1.1 受检棉花材料

3.1.2 阴性对照品种：中棉所 12 号

3.1.3 阳性对照品种：中棉所 41 号

3.2 田间种植与管理

按照当地常规播种时期、播种方式和播种量进行播种和管理。

3.3 资料记录

3.3.1 试验地名称与位置

记录试验地的名称、试验的具体地点、经纬度或全球地理定位系统地标。绘制小区示意图。

3.3.2 气象资料

记录试验期间试验地降雨（降雨类型，日降雨量以毫米表示）和温度（日平均温度、最高和最低温度、积温，以℃表示）的资料。记录影响整个试验期间试验结果的恶劣气候因素，例如严重或长期的干旱、暴雨、冰雹等。

4 试验设计与取样

4.1 试验设计

随机区组设计，3次重复，小区面积不小于 30 m²。

4.2 取样

在棉花苗期（4片-6片真叶）、蕾期（盛蕾期）和铃期（结铃盛期），每个小区随机取样20株。苗期，每株取顶部倒数第三片完全展开叶片；蕾期，每株取顶部倒数第三片完全展开叶片和1个小蕾（直径0.5cm-0.7cm）；铃期，每株取顶部倒数第三片完全展开叶片和1个小铃（直径约1.0cm）。每次取样后，将每个小区的叶片、蕾和铃分别单独置于保鲜袋内密封，放在冰盒中，迅速带回实验室检测，或用液氮速冻后，放入-80℃超低温冰箱中保存待测。

5 外源 Bt 杀虫蛋白表达量检测。

5.1 试剂盒的选择

根据待检目标蛋白的类型，选用适用于棉花外源 *Bt* 杀虫蛋白检测的 ELISA 试剂盒，试剂盒的定量限（LOQ）应≤0.5ng/g（鲜重）。

5.2 试样和试样制备

5.2.1 将每个小区采集的相同时期同一组织器官的试样作为一个样本。取0.5g组织或器官，充分研磨，加5mL1倍的提取液。

5.2.2 在振荡器上充分混匀样品，4℃ 12000 r/min 离心 15 min。吸取1mL上清液，4℃放置待测。此过程尽量在冰上处理。

5.2.3 所有的试剂与样品用之前应从冰箱中取出，放置在室温下至少30min，使它们接近室温。

5.3 检测程序

5.3.1 将待测样品稀释50倍，每个样品3次重复，50μL/孔。

5.3.2 室温放置15min，可以在摇床上水平摇动。

5.3.3 加 Enzyme Conjugate（酶交联物）50μL/孔。

5.3.4 放在盒子里保湿4℃过夜或者室温下1-2h（可以在摇床上进行）。

5.3.5 洗板机洗板，Washing buffer salines 洗涤3遍。

5.3.6 加 Substrate（显色底物），100μL/孔。

5.3.7 室温放置30min，在摇床上使其充分反应。

5.3.8 加1mol/L HCl，100μL/孔，终止显色反应。

5.3.9 测量相应的OD值（Optical density, OD）。

5.4 标准回归方程建立

把标准蛋白倍比稀释成5个浓度梯度，与待测样品一起加入到酶标板内相应位置，按5.3步骤进行检测，得到相应的光密度值（X）。根据标准蛋白浓度与光密度值的相关性建立标准回归方程 $Y=a+b \times \lg X$ ，相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。

5.5 结果计算

按式（1）计算蛋白含量：

$$\omega = (a + b \times \lg X) \times N \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ω ——蛋白浓度，单位为纳克每克（ng/g 鲜重）；

a——截距；

b——斜率；

X——光密度值

5.6 结果分析与表达

根据计算得到的受检材料和阳性对照品种（时期、组织器官）中外源 *Bt* 杀虫蛋白的含量，用方差分析的方法比较受体材料不同时期叶片中外源 *Bt* 杀虫蛋白的含量和受体材料与阳性对照各器官中外源 *Bt* 杀虫蛋白的含量差异。结果表述为：受检材料（时期、组织器官）中外源 *Bt* 杀虫蛋白的含量高（低）于当地主栽抗虫棉品种，差异达到（无显著差异）。

6 技术术语

Bt 基因：苏云金芽胞杆菌基因（*Bacillus thuringiensis*，简称 *Bt*）

7 引用和参考资料

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

NY/T672 转基因植物及其产品检测 通用要求

NY/T673 转基因植物及其产品检测 抽样

编写单位：湖南省棉花科学研究所

编写人员：梅正鼎 张志刚 蒋杰 贺云新 李彩红 李玉芳