

金嘉凤, 沈建兴, 沈成, 等. Bt Cry 毒素广谱检测的胶体金侧流免疫层析试纸研究与设计[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(10): 2057-2067.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.10.019

Bt Cry 毒素广谱检测的胶体金侧流免疫层析试纸研究与设计

金嘉凤^{1,2,3}, 沈建兴^{1,2}, 沈成^{1,3}, 陈蔚¹, 孙吉^{1,4}, 徐重新^{1,2}, 谢雅晶¹,
张霄¹, 朱庆¹, 刘媛^{1,2}, 刘贤金¹

(1.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014; 2.江苏大学食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 3.南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 211800; 4.钟山职业技术学院健康管理与健康学院, 江苏 南京 210049)

摘要: Bt Cry 毒素是转基因农产品及其产地环境安全监管的重要对象。为实现转基因农产品的 Bt Cry 毒素快速检测, 本研究基于抗体的胶体金侧流免疫层析法, 以前期制备获得的具备 Bt Cry 毒素广谱识别能力的单克隆抗体为检测抗体, 将其标记胶体金形成金标探针; 同时分别以前期制备获得的具备 Bt Cry 毒素广谱识别能力的多克隆抗体为检测线(T线)上的捕获抗体、以商品化的羊抗鼠二抗为质控线(C线)上的质控抗体, 进而依托硝化纤维素膜等组件构建形成胶体金免疫层析检测试纸, 并对其检测性能进行试验。结果表明, 本研究构建设计的胶体金免疫层析检测试纸对 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F 的最低肉眼检测线分别为 0.5 μg/mL、0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、0.5 μg/mL 和 0.5 μg/mL, 说明本研究研发的检测试纸可用于 Bt Cry 毒素的广谱快速检测, 具有较高的应用价值。

关键词: Bt Cry 毒素; 检测试纸; 侧流免疫层析; 抗体; 广谱检测

中图分类号: TS207.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)10-2057-11

Research and design of colloidal gold lateral flow immunoassay strips for broad-spectrum detection of Bt Cry toxins

JIN Jiafeng^{1,2,3}, SHEN Jianxing^{1,2}, SHEN Cheng^{1,3}, CHEN Wei¹, SUN Ji^{1,4}, XU Chongxin^{1,2},
XIE Yajing¹, ZHANG Xiao¹, ZHU Qing¹, LIU Yuan^{1,2}, LIU Xianjin¹

(1. *Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety—State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology, Nanjing 210014, China*; 2. *School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China*; 3. *College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 211800, China*; 4. *School of Health Management and Rehabilitation, Zhongshan Vocational College, Nanjing 210049, China*)

Abstract: Bt Cry toxins are important objects of environmental safety supervision of genetically modified agricultural

收稿日期: 2024-12-01

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际合作重点专项(2023YFE0-109400); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20231384); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(22)1009]

作者简介: 金嘉凤(1999-), 女, 江苏南通人, 博士研究生, 主要从事昆虫分子毒理学研究。(E-mail) jinjiafengjif@163.com

通讯作者: 徐重新, (E-mail) hhexcx@163.com; 刘媛, (E-mail) liuyuan@jaas.ac.cn

products and their producing areas. In order to realize the rapid detection of Bt Cry toxins in genetically modified agricultural products, this study was conducted based on antibody-based colloidal gold lateral flow immunochromatography, using the monoclonal antibody with broad-spectrum recognition ability of Bt Cry toxins obtained in the previous preparation as the detection antibody, and labeling it with colloidal gold to form a gold-labeled probe. At

the same time, the polyclonal antibody with broad-spectrum recognition ability of Bt Cry toxins obtained in the previous preparation was used as the capture antibody on the test line (T line), and the commercial sheep anti-mouse monoclonal antibody was used as the quality control antibody on the quality control line (C line). Then, the colloidal gold immunochromatographic test strip was constructed based on nitrocellulose membrane and other components, and its detection performance was tested. The results showed that the minimum visual detection lines of the colloidal gold immunochromatographic test strips for Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ah, Cry1B, Cry1C and Cry1F were 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. These results indicate that the test strips developed in this study can be used for broad-spectrum rapid detection of Bt Cry toxins and have high application value.

Key words: Bt Cry toxins; test strip; lateral flow immunoassay; antibody; broad-spectrum detection

Bt Cry 毒素是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 在生活史后期产孢过程中代谢分泌的一类具有特异性毒杀昆虫活性的大分子晶体蛋白,其主要以生物制剂或转基因抗虫作物的形式应用于常见农林害虫(如棉铃虫、小菜蛾、褐天牛、山杨叶甲等)以及卫生媒介蚊虫(如埃及伊蚊、白纹伊蚊、致倦库蚊等)的绿色生物防治^[1]。根据中国农药信息数据库(<http://www.chinapesticide.org.cn/>)最新统计数据显示,截至 2024 年 10 月,中国登记的生物农药中有效成分涉及 Bt 毒素的产品已经超过 250 种;而在全球范围内,涉及 Bt Cry 毒素的转基因作物类型涵盖水稻、小麦、玉米、土豆、高粱、大豆、油菜、木瓜等主要作物,每年带动相关产业增值超过 1.9×10^{10} 美元^[2]。然而,随着 Bt Cry 毒素生物制剂及其转基因抗虫作物长期广泛应用,不可避免地诱发小菜蛾、棉铃虫、草地贪夜蛾、亚洲玉米螟等重要靶标害虫的抗药性^[3];此外,越来越多的证据显示 Bt Cry 毒素对经济昆虫家蚕^[4]、取食性有益昆虫瓢虫^[5]以及模式生物秀丽隐杆线虫^[6]等非靶标生物具有较强的交互性致死毒性,还可能在一定程度上打破环境微生物种群结构平衡甚至引发基因跨物种漂移风险^[1]。上述暴露出的问题或蕴藏的潜在安全风险,使得 Bt Cry 毒素转基因作物及衍生产品备受社会关注,为此,中国政府相继颁布了《农业转基因生物安全管理条例》和《转基因植物安全评价指南》,在国家层面进一步加强对包括转 Bt Cry 毒素基因在内的转基因作物改造研究及相应产品的监督检查与安全风险评估力度。

胶体金侧流免疫层析法(Lateral flow immunoassay, LFIA)是基于胶体金纳米颗粒标记的抗体与抗原特异性结合原理构建设计的肉眼可视化快速免疫检测方法,无需专用仪器即可进行定性和半定量检测,从而实现经济和大规模的毒素检测。该检测

方法以结构简单、成本低廉、仪器可携带、易操作、测试反应快速且测试结果凭肉眼就可辨别等优势,被广泛应用于包括农药、抗生素、致病微生物及其衍生毒素等常见食品和农产品安全危害物的快速筛查检测中^[7],且已被国家标准《转基因产品检测蛋白质检测方法》(GB/T 19495.8-2004)采纳并作为推荐方法用于检测食品和环境样品中的 Bt Cry 毒素残留。近年来,针对 Bt Cry 毒素的检测方法研究取得了显著进展,尤其是在免疫检测领域。Dong 等^[8]开发了一种基于单克隆抗体的夹心 ELISA 方法,能够特异性检测 Cry1Ab 毒素,避免了与 Cry1Ac 的交叉反应,最低检测限(LOD)达到 0.47 ng/mL,适用于农产品中 Cry1Ab 毒素的定量分析。Zeng 等^[9]研制了一种多组分胶体金免疫层析试纸条,可同时检测转基因作物中的 Cry1Ab、Cry1Ac 和 CP4 EPSPS 蛋白,检测灵敏度分别为 100 ng/mL、100 ng/mL 和 5 ng/mL,检测时间仅需 10 min,适用于玉米、大豆、甜菜和棉花等多种作物。Jin 等^[10]建立了双抗体夹心酶联免疫吸附测定法(DAS-ELISA),可用于 Bt Cry 毒素 8 种常见亚型(Bt Cry1、Cry2Ab、Cry3Aa 等)的广谱检测,检测灵敏度范围为 2.36~36.37 ng/mL,并通过序列比对和三维结构模拟,按照 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F 等毒素亚型进化和结构的远近关系,特异性设计其作为免疫原的不同组合形式进行动物免疫,成功制备可同时高灵敏识别多种 Bt Cry 毒素亚型的广谱多克隆抗体和单克隆抗体。

本研究拟在上述广谱抗体材料的基础上,借助胶体金标记形成金标探针,进一步构建与设计可用于 Bt Cry 毒素广谱检测的胶体金免疫层析检测试纸产品,以期实现食品、农产品乃至环境样品中 Bt Cry 毒素残留的广谱检测。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

具有 Bt Cry 毒素广谱识别能力的单克隆抗体细胞株(命名为 JJF-GP-mAb)和多克隆抗体血清(命名为 JJF-GP-pAbs)均由江苏省食品质量安全重点实验室制备^[10]。本研究中涉及的所有类型 Bt Cry 毒素标准品均购于美延(北京)农业科技有限责任公司;辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗[Goat anti-mouse IgG mAb-(HRP)二抗]和羊抗兔二抗[Goat anti-rabbit IgG mAb-(HRP)二抗]均购于南京金斯瑞生物科技有限公司;HiTrap Protein A/G HP 购于美国 GE 公司;截留相对分子量 8 000~14 000 的透析袋 MD44 购于南京一加生物科技有限公司;样品垫、金标垫、硝化纤维膜(NC)以及吸水垫均购于美国 Millipore 公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 试验仪器

纯水仪购于美国 Millipore 公司;磁力搅拌器购于美国 SCILOGEX 公司;ZX1010 二维喷点平台购于美国 BioDot 公司;切条机购于中国 Goldbio 公司;电子扫描显微镜购于德国 Carl Zeiss 公司;玻璃瓶均经过硅化处理。

1.3 试验方法

1.3.1 JJF-GP-mAb 腹水制备及活性分析 准备经产的 Balb/c 小鼠 5 只,腹腔注射 0.5 mL 灭菌的石蜡液进行致敏,5~7 d 后每只小鼠注射 2×10^6 个 JJF-GP-mAb 细胞株到小鼠腹腔,等待小鼠腹部明显变大,收集腹水。4 ℃ 条件下 8 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀,收集上清液。通过间接酶联免疫分析法(ELISA)测定上清液与免疫原(Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F)的结合能力。具体步骤如下:在 96 孔酶标板中,将 100 μL 2 μg/mL 的免疫原 Cry 毒素蛋白(Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F)添加到酶标板孔中,每个免疫原 Cry 毒素蛋白包被 24 孔,其中包含 3 个重复,置于 4 ℃ 冰箱静置包被处理 12 h。然后取出酶标板,每孔以 200 μL 的 PBST[加入 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲液(PBS)]进行 3 次洗涤,每孔加入 200 μL 的 MPBS 封闭液(含有 4% 脱脂奶粉的 PBS),在 37 ℃ 恒温培养箱中进行封闭处理 2 h。用 PBST 洗涤处理 3 次。利用 PBS 将 JJF-GP-mAb 腹

水上清液稀释 0.2×10^4 倍、 0.8×10^4 倍、 3.2×10^4 倍、 12.8×10^4 倍、 25.6×10^4 倍,然后在酶标板中分别加入稀释后的腹水上清液、阴性血清、PBS 各 100 μL,每处理 3 孔,置于 37 ℃ 恒温环境中孵育 1 h。然后每孔用 200 μL 的 PBST 洗涤 3 次,再加入 100 μL PBS 稀释 5 000 倍的羊抗鼠二抗,置于恒温 37 ℃ 再次孵育 1 h。将 96 孔板取出,再洗涤 3 次后,每孔加入 100 μL 显色液,在暗光条件下反应 15 min 至显色。每孔加入 50 μL 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止液。在酶标板中测定各孔反应液在 450 nm 处的吸光度(OD_{450})。

JJF-GP-pAbs 血清同样按上述方法进行腹水制备,并离心获取上清液。上清液用 PBS 稀释 1.5×10^3 倍、 4.0×10^4 倍、 1.0×10^6 倍、 3.0×10^6 倍,其与免疫原结合能力的测定可参照上述步骤,其中羊抗鼠二抗替换为羊抗兔二抗。

1.3.2 抗体材料纯化制备 将腹水离心后的上清液通过饱和硫酸铵沉淀法进行初步纯化,再用 Protein G 柱进一步纯化获得单克隆抗体。具体操作如下:取 2 mL 腹水与 2 mL PBS 混合后,加入 1 mL 饱和硫酸铵溶液,混匀。室温下静置 30 min,离心机 4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,获取上清液;加入 5.0 mL 饱和硫酸铵溶液,室温下静置 30 min,4 ℃、10 000 r/min 离心 20 min,弃上清液;沉淀用 5.0 mL PBS 重悬,将 2.5 mL 饱和硫酸铵溶液逐滴加入,按照上述步骤离心去上清液,重复 1 次;沉淀加入 3 mL PBS 重悬后透析,透析 2 d 后离心,去沉淀,上清液即为饱和硫酸铵沉淀法初步纯化的抗体。将上述初步纯化的抗体、结合缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠缓冲液,pH=7.0)、洗脱缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸-HCl 缓冲液,pH=2.4)和中和缓冲液(1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,pH=9.0)等试剂分别用 0.45 μm 的滤膜过滤;用 15 mL 的结合缓冲液冲洗 Protein G 柱子里的乙醇,将初步纯化的抗体与结合缓冲液按 1:3 的体积比混合,按照 1 mL/min 上样,重复上样 5~6 次;用 15 mL 结合缓冲液冲洗柱子,洗去杂蛋白质后,用 15 mL 洗脱缓冲液洗脱目的蛋白,将含有蛋白质的洗脱液收集在 2 mL 离心管中,同时利用中和缓冲液调节 pH 至中性;目的蛋白洗脱后继续用 25 mL 洗脱液清洗柱子,将柱子上剩余蛋白质全部冲洗,采用 15 mL 结合缓冲液平衡柱子,最后利用 20% 乙醇封柱,4 ℃ 下保存;纯化的抗体-20 ℃ 保存备用。

利用 JJF-GP-pAbs 血清制备的腹水,采用饱和

硫酸铵沉淀法和 Protein A 柱纯化法获得纯的多克隆抗体,具体过程可参照上述单克隆抗体纯化步骤。

1.3.3 抗体的鉴定 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳:纯化的抗体加入4×蛋白上样缓冲液,热水煮沸 7 min,使用 12% 预制胶,上样 10 μL ,蛋白质 Marker 直接上样 5 μL ,设置恒定电压 140 V,电流 300 mA,当样品跑至玻璃板底部时,关闭电源,时间约为 1 h。结束后倒入 10 mL 蛋白质瞬蓝染色液,染色 30 min,弃去染色液,用纯水进行脱色,直至条带清晰,将预制胶置于凝胶成像分析仪的白板上进行拍照。

抗体浓度测定采用紫外分光光度计,同时采用间接酶联免疫分析法对现有 Cry 毒素包被进行检测,鉴定单克隆抗体与多克隆抗体的活性及其交叉反应,步骤可参考 1.3.1。

通过饱和硫酸铵沉淀法初步纯化腹水,再利用 Protein G 柱进一步纯化单克隆抗体,并采用 SDS-PAGE 电泳检测其纯度,-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。同时,使用间接 ELISA 法对现有 Cry 毒素包被进行检测,鉴定单克隆抗体的活性及其交叉反应。采用相同方法对多克隆抗体进行鉴定。步骤同 1.3.1,其中包被 Bt 毒素浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,加样抗体浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,共 3 个重复。

1.3.4 试纸条的组装 本研究设计的试纸条由底板、样品垫、结合垫、NC 膜和吸水垫组成。样品垫、NC 膜和吸水纸分别贴附于底板上,相邻之间覆盖 1~2 mm。靠近样品垫喷涂多克隆抗体为检测线(T 线),靠近吸水纸喷涂羊抗鼠二抗为质控线(C 线),37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 2 h 后用切条机切成 4 mm 宽的试纸条,干燥保存(图 1)。

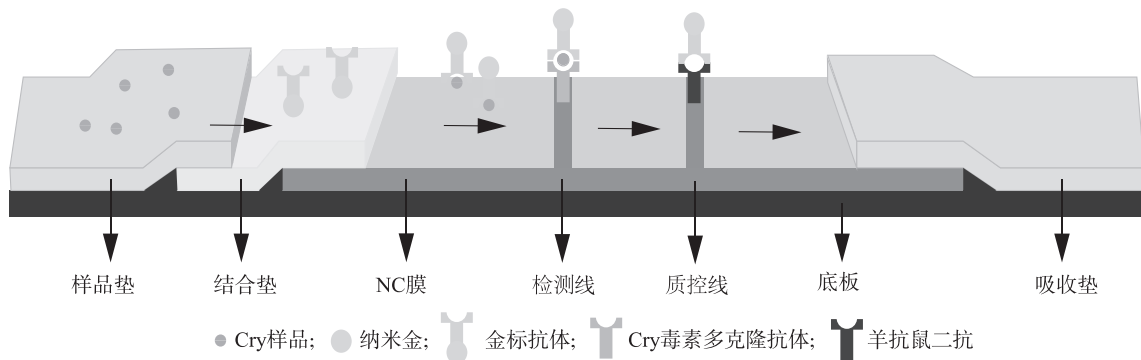


图 1 双抗夹心法试纸条的组装图

Fig.1 Assembly diagram of double-antibody sandwich lateral flow strip

1.3.5 试纸条测定方法 将试纸条下端样品垫插入 100 μL 已稀释的 Cry 毒素溶液中,Cry 毒素与金标抗体形成复合物继续向试纸条上方移动,10 min 左右观察试纸条显色情况。如果 T 线不显色,C 线显色,则为阴性,说明样品溶液中不含 Cry 毒素;如果 T 线显色,C 线显色,则为阳性,说明样品中含有 Cry 毒素,且其与金标抗体结合;如果 T 线显色,C 线不显色,或者 C、T 线均不显色,则说明此试纸条无效(图 2)。

1.3.6 胶体金颗粒的制备 在通风橱中,利用酸缸(重铬酸钾-浓硫酸混合液)中浸泡制备胶体金所用的玻璃瓶 48 h,冲洗干净后烘干,再放入 5 mL 二氯二甲基硅烷和 95 mL 三氯甲烷的混合液,摇晃使瓶身内部充分接触硅化液,10 min 后倒出硅化液并烘干。

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金:取 200 mL

超纯水加入到 500 mL 玻璃瓶中,加入 3 mL 1% HAuCl_4 溶液加热至沸腾,迅速加入 1% 柠檬酸三钠溶液 6 mL,添加过程中柠檬酸三钠溶液不接触玻璃瓶壁,继续加热 5 min。待溶液冷却后再加入 91 mL 超纯水,得到胶体金溶液。观察玻璃瓶中的胶体金溶液颜色,并用移液枪将胶体金溶液滴加在 300 目的铜网上,晾干后利用电镜观察胶体金颗粒形态。剩余胶体金溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.3.7 金标抗体条件的优化 最佳 pH 值的确定:取 1.5 mL 离心管 12 个,每管加入 1 mL 胶体金溶液,再分别加入 5 μL 、6 μL 、7 μL 、8 μL 、9 μL 、10 μL 、11 μL 、12 μL 、13 μL 、14 μL 、15 μL 、16 μL 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液来调节溶液不同的 pH 值轻轻混匀,然后每管加入 14 μL 质量浓度为 1.5 mg/mL 的 1A10-mAb 广谱抗体。轻轻摇匀上述混合液,在室

温下静置 2 h, 观察溶液是否有颜色变化及沉淀。将混合液 10 000 r/min 离心 30 min, 弃沉淀, 上清液用于间接 ELISA 法测定。选取最小 OD_{450} 所对应的溶液 pH 值为最佳 pH 值。

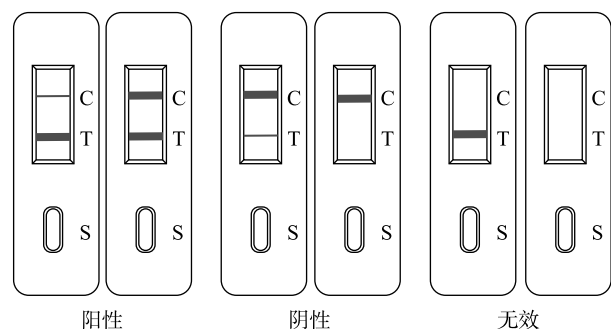


图2 试纸条测定结果的判定

Fig.2 Illustration of results judged as positive, negative or invalid

最佳抗体标记量的确定: 采用 Mey 氏法测定胶体金标记的最小抗体量。在确定最佳 pH 值的条件下, 取 10 个 1.5 mL 离心管, 每管加入 0.5 mL 胶体金溶液, 及最佳 pH 值所需的 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液, 轻轻混匀。依次加入不同浓度的 JJF-GP-mAb 抗体溶液, 使得抗体终质量浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、1.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 、3.5 $\mu\text{g/mL}$ 、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 、4.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.5 $\mu\text{g/mL}$ 、6.0 $\mu\text{g/mL}$ 、6.5 $\mu\text{g/mL}$ 、7.0 $\mu\text{g/mL}$ 、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 、8.5 $\mu\text{g/mL}$ 、9.0 $\mu\text{g/mL}$, 室温静置 4 min。之后每管加入 50 μL 10% NaCl 溶液, 静置 4 min 后用肉眼观察颜色变化, 颜色稳定且未发生变化的最小抗体标记浓度即为最佳浓度。

1.3.8 胶体金试纸条最低检测限的测定 胶体金试纸条最低检测限是指能够用肉眼明显观察到红线的 Cry 毒素的最低浓度。以 PBS 缓冲液为阴性对照, 利用胶体金试纸条对 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F 等 6 种毒素标准缓释液进行检测。方法如下: 在 96 孔板中, 向每个孔分别加入 100 μL 不同质量浓度的毒素稀释液和 PBS 缓冲液, 将组装好的胶体金试纸条插入孔板中, 每种毒素每个浓度 3 个重复。反应 10 min 用肉眼观察 C 线和 T 线, 当 T 线显色最低时的 Cry 毒素浓度为试纸条最低检测限。

1.3.9 胶体金试纸条特异性的测定 将 Cry1Ab、

Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C、Cry1F 6 种毒素和 Cry2Ab、Cry3Aa 毒素标准品溶液稀释至 5 $\mu\text{g/mL}$, Cry1Aa、Cry1Ie、Cry2Aa、Cry3Bb、Vip3Aa 标准品溶液稀释至 50 $\mu\text{g/mL}$, 加入 96 孔酶标板中, 每孔 100 μL 。以 PBS 溶液为阴性对照, 用胶体金试纸条测定检测试纸的特异性, 8 min 观察显色结果。每处理 3 个重复。

2 结果与分析

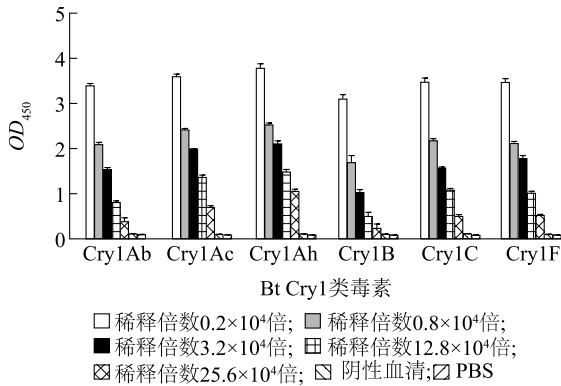
2.1 广谱抗体制备结果

间接 ELISA 检测分析结果显示, 以 JJF-GP-mAb 细胞株免疫制备得到的腹水稀释液能够保持广谱识别 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F 等 6 种 Cry1 类毒素的能力, 以间接 ELISA 的 $OD_{450} \geq 1.0$ 为标准, Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C 和 Cry1F 的滴度分别达 3.2×10^4 、 12.8×10^4 、 25.6×10^4 、 3.2×10^4 、 12.8×10^4 和 12.8×10^4 , 说明制备的腹水识别效果较好(图 3)。收集到的腹水, 通过饱和硫酸铵沉淀法粗纯化腹水中的抗体, 并利用 Protein G 柱进一步纯化, SDS-PAGE 电泳结果(图 4)显示, 纯化后的抗体显示出较高的纯度, 紫外分光光度计检测结果显示其浓度为 1.14 mg/mL。间接 ELISA 法测定抗体活性结果(图 5)显示, 纯化制备的单克隆抗体具有结合多种 Bt Cry 毒素抗原的能力, 能够广谱识别包括 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C、Cry1F、Cry2Ab 和 Cry3Aa 在内的多种 Bt Cry 毒素亚型(图 5)。冻存的含有 JJF-GP-pAbs 的免疫兔血清仍然具有广泛识别 6 种 Cry1 类毒素的能力, Cry1Ab、Cry1B 的血清滴度均达到 4.0×10^4 , Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1C、Cry1F 的血清滴度可达到 1.0×10^6 (图 6), 且该血清经饱和硫酸铵沉淀和过柱纯化后收集获得的纯多克隆抗体蛋白质溶液(图 7), 经紫外分光光度计检测, 其质量浓度为 8.26 mg/mL, 该纯蛋白质同样保持对 Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C、Cry1F、Cry2Aa、Cry2Ab 和 Cry3Aa 等 Cry1 类毒素的高识别结合能力(图 8)。由此说明, 本研究制备纯化的 JJF-GP-mAb 和 JJF-GP-pAbs 蛋白均保持对 Cry1 类毒素的高识别结合能力, 这为后续设计胶体金侧流免疫层析法试纸奠定了良好的材料基础。

2.2 胶体金颗粒的测定

采用柠檬酸三钠法制备的胶体金溶液在灯光下观察, 颜色为酒红色(图 9A)。将制备好的胶体金

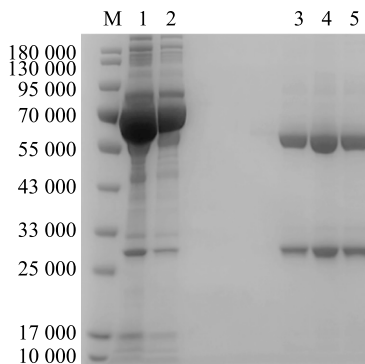
溶液用移液枪滴加在 300 目铜网上,晾干后通过电镜观察到的胶体金颗粒形状与大小如图 9B 所示。从图中可以看出,制备的胶体金颗粒呈圆形,粒径约 30 nm,且大小均匀、分散。紫外扫描仪分析结果显示,在约 520 nm 处存在显著的单吸收峰(图 9C)。上述结果说明,本研究所制备的胶体金颗粒适用于后续的试验操作。



PBS:磷酸盐缓冲液; OD_{450} :450 nm 处的吸光度。

图 3 以 JJF-GP-mAb 细胞株免疫制备得到的腹水稀释液对 Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 1Ah, Cry 1B, Cry 1C 和 Cry 1F 的间接非竞争酶联免疫吸附试验测定结果

Fig.3 Indirect non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay results of ascites dilutions derived from JJF-GP-mAb cell line against Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 1Ah, Cry 1B, Cry 1C and Cry 1F



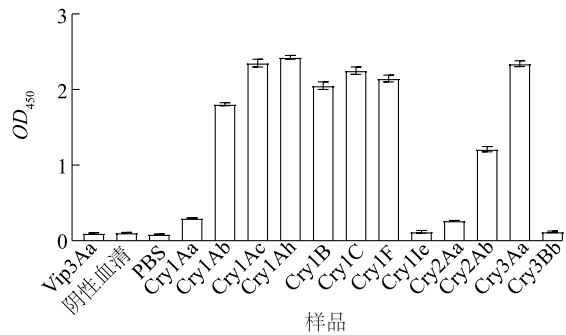
M:蛋白质 Marker;1~2:过 Protein G 柱的未结合腹水;3~5:由 β -巯基乙醇变性缓冲液处理的单克隆抗体。

图 4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 检测抗 Cry1 类毒素单克隆抗体的纯化效果

Fig.4 Verification of purification effect of anti-Cry1 toxin monoclonal antibodies by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

2.3 胶体金免疫层析试纸条的优化

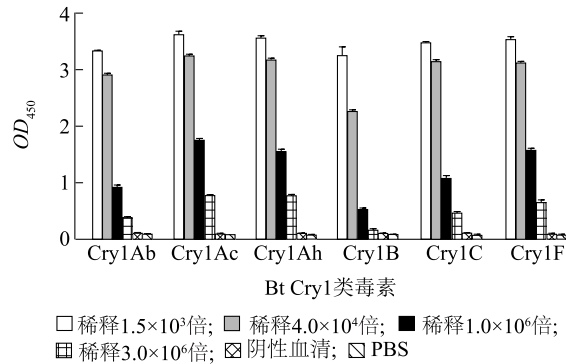
2.3.1 胶体金标记最佳 pH 值的确定 从图 10 中可



PBS:磷酸盐缓冲液; OD_{450} :450 nm 处的吸光度。

图 5 纯化的 mAb 基于间接非竞争酶联免疫吸附法对 Bt Cry 毒素的广谱识别分析

Fig.5 Broad-spectrum recognition analysis of the purified mAb against Bt Cry toxins based on indirect noncompetitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

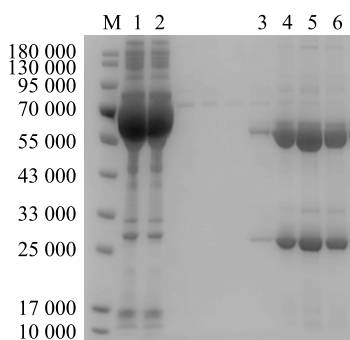


PBS:磷酸盐缓冲液; OD_{450} :450 nm 处的吸光度。

图 6 以 JJF-GP-pAbs 血清免疫制备得到的腹水稀释液对 Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 1Ah, Cry 1B, Cry 1C 和 Cry 1F 的间接非竞争酶联免疫吸附试验测定结果

Fig.6 Indirect non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay results of ascites dilutions prepared from JJF-GP-pAbs serum immunization against Cry 1Ab, Cry 1Ac, Cry 1Ah, Cry 1B, Cry 1C and Cry 1F

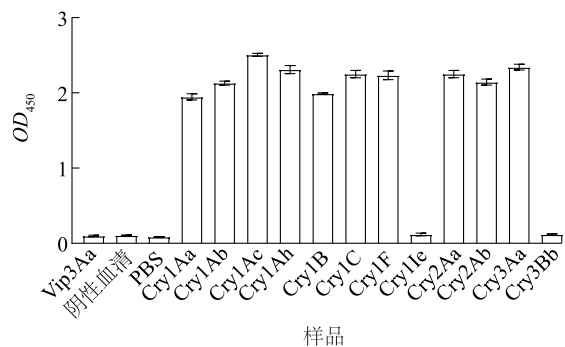
以看出,随着 K_2CO_3 溶液(浓度 0.1 mol/L)添加体积的增加,离心上清液的 OD_{450} 呈现先下降后上升的变化趋势。Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1B 和 Cry1F 在加入 14 μ L K_2CO_3 溶液时吸光值最小,Cry1Ah、Cry1C 在加入 13 μ L K_2CO_3 溶液时吸光值最小,这说明抗体与胶体金颗粒结合的最多,上清液中含有的游离抗体较少。由于 Bt Cry 毒素在加入 14 μ L K_2CO_3 溶液时吸光值接近最小值,且达到广谱的效果,因此,本研究认为 K_2CO_3 溶液的适宜添加剂量为每 1 mL 胶体金溶液中加入 14 μ L 浓度为 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 溶液。



M: 蛋白质 Marker; 1~2: 过 Protein G 柱的未结合腹水; 3~6: 由 β -巯基乙醇变性缓冲液处理的多克隆抗体。

图 7 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 检测抗 Cry1 类毒素多克隆抗体的纯化效果

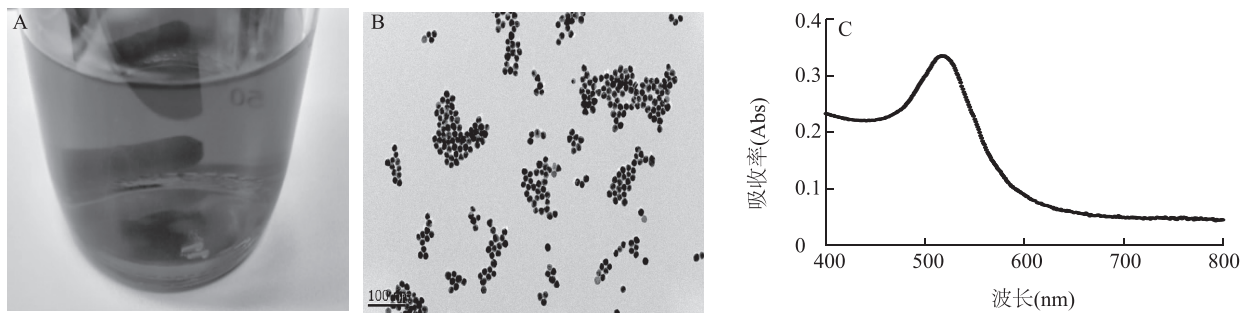
Fig.7 Verification of purification effect of anti-Cry1 toxin polyclonal antibodies by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)



PBS: 磷酸盐缓冲液; OD_{450} : 450 nm 处的吸光度。

图 8 纯化的 pAbs 基于间接非竞争酶联免疫吸附法对 Bt Cry 毒素的广谱识别分析

Fig.8 Broad-spectrum recognition analysis of the purified pAbs against Bt Cry toxins based on indirect non-competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)



A: 胶体金溶液; B: 胶体金溶液的电镜扫描结果; C: 胶体金溶液的紫外扫描仪扫描结果。

图 9 胶体金溶液及其电镜扫描和紫外扫描仪扫描结果

Fig.9 The colloidal gold solution and its transmission electron microscopy image and UV scanning spectrum

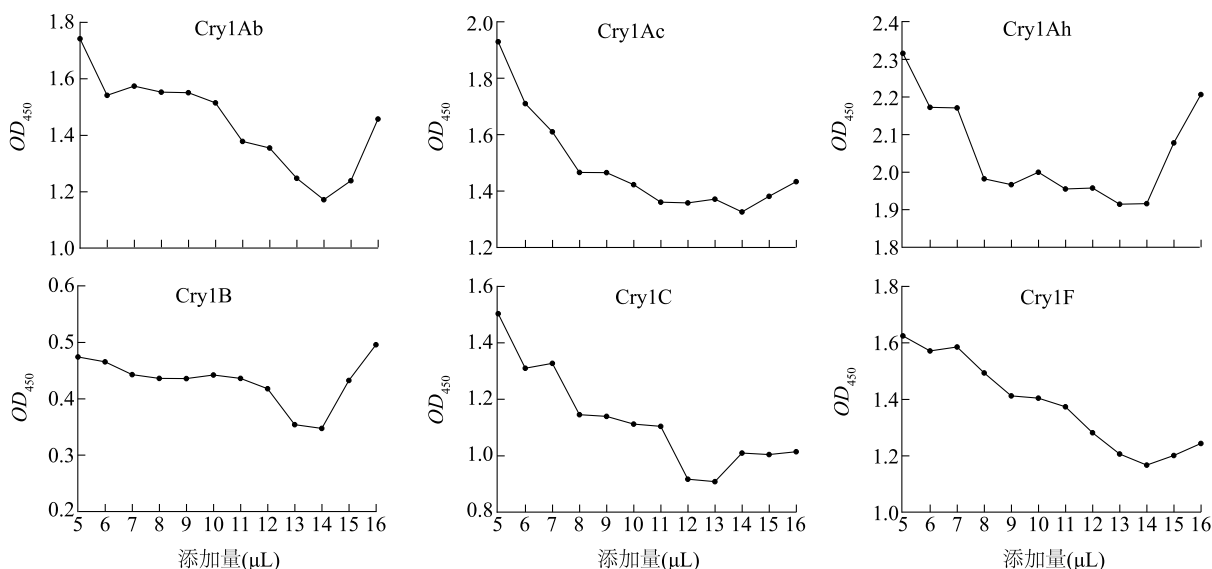
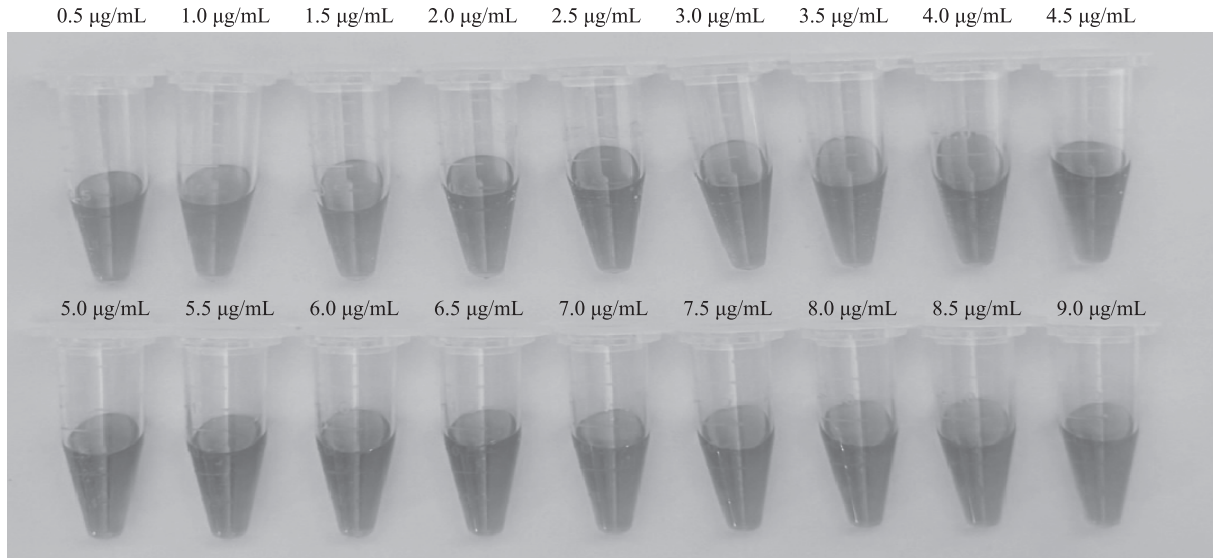


图 10 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液添加量对离心上清液 450 nm 吸光度 (OD_{450}) 的影响

Fig.10 Effect of addition amount of 0.1 mol/L K_2CO_3 solution on the absorbance at 450 nm (OD_{450}) of centrifugal supernatant

2.3.2 胶体金标记最佳抗体量的确定 不同质量浓度 JJF-GP-mAb 抗体的胶体金溶液对 NaCl 的响应特征如图 11 所示。从图中可以看出,当胶体金溶液中抗体添加质量浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及以上时,添加 NaCl 后,胶体金溶液能保持稳定,维持原本的酒红

色;而当胶体金溶液中抗体添加质量浓度低于 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,添加 NaCl 后,胶体金溶液颜色迅速变暗,说明此时胶体金溶液不能保持稳定,发生聚沉现象,因此,本研究在进行标记时,选择抗体添加质量浓度为 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~9.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为抗体终质量浓度。

图 11 不同质量浓度 JJF-GP-mAb 抗体的胶体金溶液对 NaCl 的响应特征

Fig.11 Response characteristics of colloidal gold solution with different mass concentrations of JJF-GP-mAb antibody to NaCl

2.4 性能测试

2.4.1 最低肉眼检测浓度的确定 胶体金试纸条对不同浓度 Cry1 类毒素标准溶液检测结果如图 12 所示。从图中可以看出,随着标准溶液毒素浓度的降低,试纸条上 T 线颜色逐步变浅,Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C、Cry1F 毒素标准溶液试纸条最低肉眼检测线对应的质量浓度分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4.2 胶体金试纸条对 Bt 毒素的交叉反应的测定

如图 13 所示,当 Cry1 类毒素、Cry2Ab 和 Cry3Aa 毒素标准品溶液稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,试纸条可以识别;当 Cry1Aa、Cry1Ie、Cry2Aa、Cry3Bb、Vip3Aa 标准品溶液稀释至 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,试纸条无显色反应,即试纸条 T 线与阴性对照一致,均不显色,说明本研究建立的试纸条无交叉反应。

3 讨论与结论

为了提高害虫防治效果和延缓害虫对 Bt Cry

毒素抗性的出现,许多不同的 Cry 基因已被分别或联合构建到植物中^[11]。因此,目前的农产品存在一定的 Bt Cry 毒素风险,需要对其 Cry 毒素进行广谱性筛查。本研究利用前期制备的能够识别 8 种 Cry 毒素的单克隆抗体和识别 10 种 Cry 毒素的多克隆抗体^[10]进行胶体金检测试纸研发。与 Shen 等^[12]建立的可识别 4 种 Cry 毒素的受体抗体夹心法、Dong 等^[13]建立的可识别 7 种 Cry1 类毒素的混合免疫法相比,本研究研发的胶体金试纸条检测范围更广,且能跨类识别 Cry1、Cry2、Cry3 类毒素。本研究进一步明确胶体金标记最佳 pH 值条件下的溶液配比为 1 mL 胶体金溶液中加入 14 μL 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液,胶体金标记最佳抗体添加质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。该优化条件与 Dong 等^[14]建立的 1 mL 胶体金溶液中加入 11 μL 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液及抗体添加质量浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的优化条件相比,本研究建立的优化方法所需要的抗体量更少,这有利于降低试纸应用成本。本研究建立的试纸条可检测 Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1Ah、Cry1B、Cry1C、Cry1F、

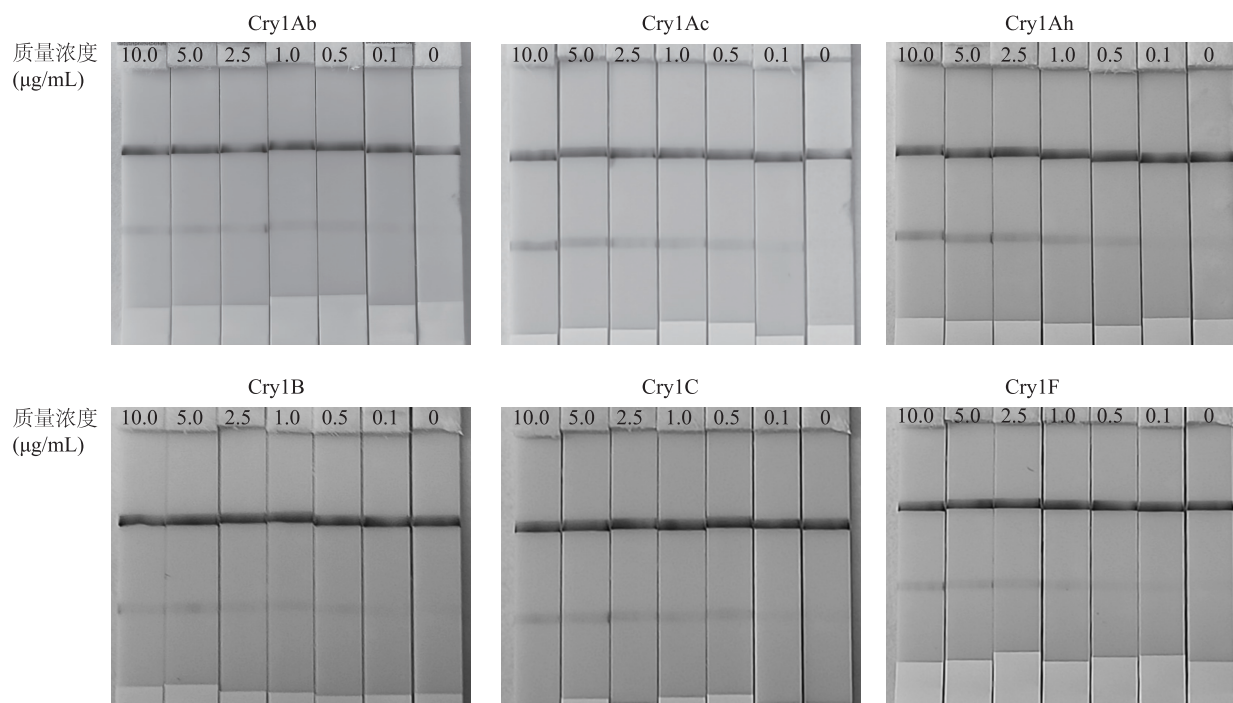


图 12 胶体金试纸条对不同浓度 Cry1 类毒素标准溶液检测结果

Fig.12 The detection results of colloidal gold test strips for different concentrations of Cry1 toxin standard solutions

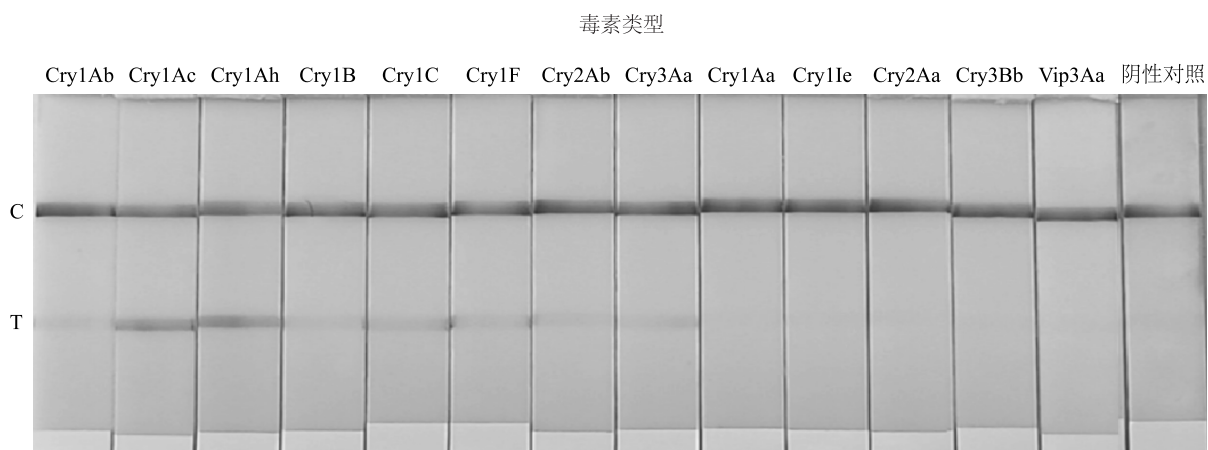


图 13 胶体金试纸条对 Bt 毒素的交叉反应测定结果

Fig.13 The results of cross reaction of colloidal gold test strips to Bt toxins

Cry2Ab、Cry3Aa 毒素,其中 Cry1Ab、Cry1Ah、Cry1C、Cry1F 等毒素的最低检测限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cry1Ac 毒素的最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cry1B 毒素的最低检测限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究建立的试纸对 Cry1Ac 毒素的检测灵敏度与 Zeng 等^[9]研发的多组分免疫检测试纸一致,而对 Cry1Ab 毒素的检测灵敏度相对较低。目前,Bt Cry 基因在农作物组织中的

表达水平随农作物类型和转基因方法有较大变异,每 1 g 作物组织中的 Cry 毒素含量一般在几微克至几百微克之间,因此本研究建立的检测试纸足以检测作物组织中的 Cry 类毒素,且可测毒素类型更多。与市面上商品化的试剂盒相比,本研究建立的检测试纸检测范围更广,但灵敏度方面相对较低。在进一步的研究中,可能采用特殊的捕获偶联方法或使

用特殊发光物质(如荧光)作为标记指示抗体,突破抗体亲和力的限制,提升检测方法的灵敏度。Liu 等^[15]开发了一种基于生物素化纳米抗体的金纳米颗粒免疫快速检测法,其检测限低至 0.88 ng/mL,能够快速、准确地检测农作物中的腐霉利残留量;Wang 等^[16]研发了一种基于等离激元空心银/金纳米星(HAg/Au NSts)增强光吸收的高灵敏度双模侧向流免疫分析(LFIA)方法,能够在可见光和近红外光两个模式下进行检测,检测灵敏度分别达到 0.29 ng/mL 和 0.09 ng/mL;Zhao 等^[17]开发了一种基于金银合金空心纳米壳的侧向流免疫测定方法,能够实现 SARS-CoV-2 中和抗体的比色、光热和表面增强拉曼散射(SERS)3 模态检测,并构建了 3 模态试纸条,提高了检测的准确性,检测灵敏度为 20 ng/mL。Wang 等^[18]设计的以链亲和素串联量子点(Avi/SA@QDs)标记的纳米抗体、Xu 等^[19]使用时间分辨荧光微球(TRFM)及 Zhang 等^[20]利用乳酸菌作为微载体负载增强型绿色荧光蛋白均实现了高灵敏度检测,检测灵敏度分别达到 1.25 ng/mL、3.00 pg/mL 和 0.21 pg/mL。相较于传统的胶体金侧流免疫层析法,量子点标记、等离激元增强、荧光标记等技术可显著提高检测灵敏度。虽然胶体金侧流免疫层析法灵敏度受限,但检测时无需依赖设备,而等离激元增强技术需要红外检测设备且需要优化纳米材料,量子点标记技术和荧光标记技术需要荧光检测仪,应用时受限于设备需求。

本研究制备的能识别多种 Bt Cry 毒素的胶体金免疫层析试纸条在广谱检测方面具有良好的应用价值,可实现 Bt Cry 毒素残留水平的快速筛查,在田间或实验室内检测不同害虫种群体内 Bt Cry 毒素的摄取或降解情况,为抗药性早期预警提供数据支持;可用于快速筛查环境样品(如土壤、灌溉水、农产品残留)中的 Bt Cry 毒素,弥补传统色谱/质谱检测方法在便携检测方面的不足;可用于检测农业生态系统中的 Bt Cry 毒素蛋白,从而间接反映转基因表达产物的扩散范围。综上所述,胶体金免疫层析技术不仅可用于食品及农产品中的 Bt Cry 毒素残留检测,还能服务于抗药性害虫监测、环境污染追踪及转基因安全评估,为 Bt Cry 毒素的科学监管提供便捷、高效的检测手段。

参考文献:

[1] 徐重新,金嘉凤,孙晓明,等. 基于 Bt 毒素的杀虫蛋白理性设

计与创新应用策略[J]. 中国农业科学,2024,57(1):96-125.

- [2] ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2019: biotech crops drive socio-economic development and sustainable environment in the new frontier[M]. Ithaca, NY: ISAAA, 2019.
- [3] JURAT-FUENTES J L, HECKEL D G, FERRÉ J. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* [J]. Annual Review of Entomology, 2021, 66: 121-140.
- [4] LIU Y X, ZHOU Z S, WANG Z Y, et al. Replacement of loop2 and 3 of Cry1Ai in domain II affects specificity to the economically important insect *Bombyx mori* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2020, 169: 107296.
- [5] SCHMIDT J E U, BRAUN C U, WHITEHOUSE L P, et al. Effects of activated bt transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2009, 56(2): 221-228.
- [6] LUO H, XIONG J, ZHOU Q N, et al. The effects of *Bacillus thuringiensis* Cry6A on the survival, growth, reproduction, locomotion, and behavioral response of *Caenorhabditis elegans* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(23): 10135-10142.
- [7] WU P C, SONG J R, SUN C X, et al. Recent advances of lateral flow immunoassay for bacterial detection: capture-antibody-independent strategies and high-sensitivity detection technologies [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2023, 166: 117203.
- [8] DONG S, ZHANG C Z, LIU Y, et al. Establishment of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin utilizing a monoclonal antibody produced with a novel hapten designed with molecular model [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409(8): 1985-1994.
- [9] ZENG H J, WANG J B, JIA J W, et al. Development of a lateral flow test strip for simultaneous detection of BT-Cry1Ab, BT-Cry1Ac and CP4 EPSPS proteins in genetically modified crops [J]. Food Chemistry, 2021, 335: 127627.
- [10] JIN J F, CHEN W, XU C X, et al. Rational design and application of broad-spectrum antibodies for Bt Cry toxins determination [J]. Analytical Biochemistry, 2024, 693: 115584.
- [11] KRANTHI K R, STONE G D. Long-term impacts of bt cotton in India [J]. Nature Plants, 2020, 6(3): 188-196.
- [12] SHEN C, MENG M, JIN J F, et al. Establishment of novel receptor-antibody sandwich assays to broadly detect *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Cry2 toxins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254: 128034.
- [13] DONG S, ZHANG C Z, LIU Y, et al. Simultaneous production of monoclonal antibodies against *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1 toxins using a mixture immunization [J]. Analytical Biochemistry, 2017, 531: 60-66.
- [14] DONG S, LIU Y, ZHANG X, et al. Development of an immunochromatographic assay for the specific detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin [J]. Analytical Biochemistry, 2019, 567:

- 1-7.
- [15] LIU M L, HE X T, XU Z L, et al. Development of a biotinylated nanobody-based gold nanoparticle immunochromatographic assay for the detection of procymidone in crops[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(35):13137-13146.
- [16] WANG X T, CHANG S H, ZHANG X L, et al. A highly sensitive dual-mode lateral flow immunoassay based on plasmonic hollow Ag/Au nanostars enhancing light absorption[J]. *Talanta*, 2024, 280:126683.
- [17] ZHAO T Y, LIANG P H, REN J Q, et al. Gold-silver alloy hollow nanoshells-based lateral flow immunoassay for colorimetric, photo-thermal, and SERS tri-mode detection of SARS-CoV-2 neutralizing antibody[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1255:341102.
- [18] WANG X Y, SUN T Q, SHEN W L, et al. A lateral flow immunochromatographic assay based on nanobody-oriented coupling strategy for aflatoxin B1 detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2023, 394:134419.
- [19] XU J, SUN J D, LU X, et al. A highly sensitive fluorescence immunochromatography strip for thiacloprid in fruits and vegetables using recombinant antibodies[J]. *Talanta*, 2023, 256:124258.
- [20] ZHANG F Y, CHEN J J, ZHAO F K, et al. Microfabrication of engineered *Lactococcus lactis* biocarriers with genetically programmed immunorecognition probes for sensitive lateral flow immunoassay of antibiotic in milk and lake water[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2024, 252:116139.

(责任编辑:石春林)