

武爱华, 张 霄, 刘 媛, 等. Cry2Aa 毒素结合十二肽的筛选与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 929-934.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.035

## Cry2Aa 毒素结合十二肽的筛选与鉴定

武爱华<sup>1,2</sup>, 张 霄<sup>1</sup>, 刘 媛<sup>1,2</sup>, 赵 扬<sup>1</sup>, 赵岩岩<sup>1,2</sup>, 张存政<sup>1</sup>, 谢雅晶<sup>1</sup>, 刘贤金<sup>1,2</sup>  
(1. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所/农业部食品质量安全监控重点开放实验室, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用 Cry2Aa 毒素蛋白对噬菌体展示随机十二肽库进行 4 轮筛选, 并从第 4 轮筛选产物中随机挑选 20 个单克隆, 进行单克隆 ELISA、PCR 扩增、DNA 电泳及测序, 鉴定这些克隆与 Cry2Aa 毒素的结合活性。结果显示, 这 20 个克隆均能与 Cry2Aa 毒素发生特异性结合, 并推导出 8 条不同的序列。挑取阳性值最高的克隆 GT(氨基酸序列为 GTPWHHRHLIV) 建立了基于十二肽的 Cry2Aa 毒蛋白的间接竞争 ELISA 检测方法。该方法的抑制中浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $1.139\ 0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 最低检测限  $IC_{10}$  为  $0.021\ 1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , 线性检测范围为  $0.047\ 8\sim 22.691\ 0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $Y=23.09\lg x+48.692$ ,  $R^2=0.996\ 3$ )。噬菌体展示肽库筛选方法为快速、准确地检测 Cry2Aa 毒蛋白提供了新的途径。

**关键词:** Cry2Aa 毒素; 噬菌体展示肽库; ELISA

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)04-0929-06

## Screening and identification of Cry2Aa-binding peptides from a phage 12-mer peptide library

WU Ai-hua<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, LIU Yuan<sup>1,2</sup>, ZHAO Yang<sup>1</sup>, ZHAO Yan-yan<sup>1,2</sup>, ZHANG Cun-zheng<sup>1</sup>, XIE Ya-jing<sup>1</sup>, LIU Xian-jin<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** A phage displayed random 12-mer peptide library (Ph. D.-12TM Phage Display Peptide Library) is screened with Cry2Aa toxin. After 4 rounds of panning, 20 single colonies were selected randomly, and the positive clones are identified by monoclonal phage competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and PCR, DNA electrophoresis and sequencing. Totally 8 peptides, which could recognize Cry2Aa specifically have been confirmed. The peptide (amino acid sequence: GTP-WHHRHLIV) holding better binding ability was employed to develop an indirect competitive ELISA for the Cry2Aa detection. The peptide-based indirect competitive ELISA showed that the  $IC_{50}$  was  $1.139\ 0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , the minimum detection limit was  $0.021\ 1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ , and the linear detection ranged from  $0.047\ 8$  to  $22.691\ 0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ . With this new detection method, Cry2Aa can be detected rapidly and accurately.

**Key words:** Cry2Aa toxin; phage-display peptide library; ELISA

收稿日期: 2015-01-28

基金项目: 国家“973”项目(2012CB722505); 国家自然科学基金项目(3111343, 31201535)

作者简介: 武爱华(1988-), 女, 山西忻州人, 硕士研究生, 从事农药毒理与毒副作用研究。(Tel) 18761865017; (E-mail) zhizhuodelei@163.com

通讯作者: 刘贤金, (Tel) 13805178778; (E-mail) jaasliu@jaas.ac.cn

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种革兰氏阳性( $G^+$ )细菌, 是目前产量最大、使用最广的生物杀虫剂<sup>[1]</sup>。近年来, 随着转 Bt 作物在全球

大规模商品化种植,使得其存在潜在的生态风险。目标害虫对药物产生耐受性,杀虫基因逃逸污染环境,生物多样性下降以及对非目标生物的间接危害风险和破坏生态平衡等<sup>[2-6]</sup>。因此建立适当的检测方法对于转基因产品成分快速鉴定与检测,促进转基因产品安全管理、市场监管和风险评估具有重要的研究意义。

近年来,随着基因工程抗体及噬菌体展示技术的兴起,利用噬菌体展示技术筛选并建立针对 Bt 毒素免疫检测方法已有很多报道。张霄、王耘等利用人源化噬菌体单链抗体库筛选获得针对 Bt 毒蛋白的单链抗体(scFv),进而建立免疫学分析方法<sup>[7-8]</sup>,但是噬菌体抗体库抗体多数是 Fab 片段或 scFv 抗体,对抗体的亲和力有一定的影响。随着噬菌体展示肽库技术的不断改进和完善,其在生命科学的众多领域得到了广泛应用,在免疫分析中的应用主要表现在模拟表位筛选、抗免疫复合体筛选及基于噬菌体展示多肽的特点建立的新免疫分析方法<sup>[9]</sup>。Renrong Liu 等从七肽库中筛选与 OTA(赭曲霉毒素 A)相竞争的多肽,建立竞争 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)方法检测谷物中的 OTA,并与传统检测方法相比较,结果显示检出数值差异不显著,且与其类似物之间的交叉反应率低于 0.01%,说明肽库筛选特异性好,且亲和性高<sup>[10]</sup>。在 Bt 蛋白方面,已有李利红等从七肽库中筛选与 Bt 蛋白结合的多肽,运用于转基因植物中 Bt 蛋白的辅助检测<sup>[11]</sup>。

目前已发现的 cry2 类基因有 52 个,其编码的蛋白大小约为 70 000<sup>[12]</sup>,其中以 cry2Aa 的应用和研究较多<sup>[13-17]</sup>。本研究拟通过噬菌体肽库固相筛选,获得特异性结合 Cry2Aa 的十二肽,建立新的检测方法,应用于抗虫转基因植物中 Bt 蛋白的检测领域。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Cry2Aa 毒素蛋白标准品,购于上海佑隆生物科技有限公司;噬菌体随机十二肽库(Ph. D. -12 library, 库容  $1.9 \times 10^9$ )、受体菌 *Escherichia coli* ER 2738 以及-96 g III 测序引物;5'-HOCCTCATAGTTAGCGTAACG-3',购于 New England Biolabs;HRP-抗 M13 单克隆抗体购于 Pharmacia 公司;牛血清白蛋白(BSA)、四环素(Tetracycline)、异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)及 Xgal 购于 SIGMA 公司;Cry2Aa 多抗(PAb-

Cry2Aa)为免疫新西兰纯种雄性大白兔获得。

### 1.2 以 Cry2Aa 筛选噬菌体十二肽库

1.2.1 固相亲和筛选策略 ①用包被液(pH=8.6, 0.1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ) 稀释 Cry2Aa 毒素蛋白至浓度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,取 1 ml 包被 6 孔无菌酶联免疫板,用封口膜封口,4  $^\circ\text{C}$ , 20 r/min 震荡过夜进行包被;②次日弃去包被液,加入 4 ml 封闭液(0.1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mg/ml BSA, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 4  $^\circ\text{C}$  静置 2 h;③弃去封闭液, TBST (pH=7.5, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 快速洗涤 6 次,取 10  $\mu\text{l}$  原始库溶液(含  $4 \times 10^{11}$  噬菌体)用 1 ml TBST 稀释,加入免疫孔中, 25  $^\circ\text{C}$ , 50 r/min 摇动 1 h;④移去肽库溶液, TBST 洗涤免疫孔 10 次,加入 500  $\mu\text{l}$  Cry2Aa(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 竞争洗脱, 25  $^\circ\text{C}$ , 50 r/min 摇动 1 h,把洗脱液移至 1.5 ml 离心管内,共进行 4 轮亲和筛选,竞争洗脱。

第 2~4 轮的筛选维持原 Cry2Aa 的包被浓度,加入负筛选(包被 BSA 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 封闭 5 mg/ml BSA, 先将肽库加入到此孔中, 25  $^\circ\text{C}$ , 50 r/min 摇动 1 h),之后将肽库转移至包被有 Cry2Aa 的正筛选孔中,增加 Tween-20 浓度至 0.5%,第 2~4 轮洗涤次数逐级递加,分别为 10 次、20 次和 30 次,依然加入 500  $\mu\text{l}$  Cry2Aa(100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 竞争洗脱 1 h。

1.2.2 洗脱噬菌体扩增 将洗脱液加入到 20 ml 对数前期的 *E. coli* ER 2738 菌液中, 37  $^\circ\text{C}$ , 250 r/min 培养 4.5 h,特异性结合的噬菌体克隆得到扩增, 4  $^\circ\text{C}$  12 000 r/min 离心 15 min,将上清液转移到新的离心管中,用 1/6 体积的 PEG/NaCl (20% PEG8000, 2.5 mol/L NaCl) 沉淀噬菌体, 4  $^\circ\text{C}$  过夜。次日, 12 000 r/min 4  $^\circ\text{C}$  离心 25 min,弃上清液,用 1 ml TBS 重悬沉淀,再用 1/6 体积的 PEG/NaCl 沉淀噬菌体, 4  $^\circ\text{C}$  静置 1 h, 14 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 200  $\mu\text{l}$  TBS 重悬, 4  $^\circ\text{C}$  14 000 r/min 离心 1 min,上清液即为扩增后的噬菌体。

1.2.3 噬菌体滴度测定 以 1:100 接种 *E. coli* ER 2738 于 LB-Tet 液体培养基中, 37  $^\circ\text{C}$ , 250 r/min 扩增 4.5 h 至对数中期( $OD_{600}=0.5$ )。分别加 200  $\mu\text{l}$  对数中期的菌液至 10 个 EP 管中,将各轮投入和产出的噬菌体用 LB 培养液 10 倍

系列稀释,每个稀释度各取 10  $\mu\text{l}$  分别加入到盛有菌液的 EP 中,快速震荡,室温孵育 5 min。将感染的菌液与 3 ml 45  $^{\circ}\text{C}$  预温的顶层培养基快速混匀,快速倒入 37  $^{\circ}\text{C}$  预温的 LB/IPTG/Xgal/Tet 培养板上,适当倾斜培养板将顶层琼脂均匀摊开。冷却 5 min 后,将培养板倒置放于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱避光过夜培养。次日观察培养板,选择蓝斑数少于 100 的培养板计数,蓝斑数乘以稀释倍数即为噬菌体滴度(pfu/ml)。

### 1.3 噬菌体克隆的鉴定

1.3.1 单克隆 ELISA 4  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 包被 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜包被。弃去包被液,每孔加 200  $\mu\text{l}$  封闭液(0.1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ,5 mg/ml BSA,0.02%  $\text{NaN}_3$ ),4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。弃去封闭液,TBST 洗板 6 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  噬菌体悬液(含  $1 \times 10^{12}$  个噬菌体),室温结合 2 h。弃去一抗,TBST 洗板 6 次。每孔加入 100  $\mu\text{l}$  酶标抗-M13 单抗(1:5 000),室温结合 1 h。TBST 洗板 6 次,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  ABTS 显色液,室温 15 min,测  $OD_{450}$ 。阴性对照组采用 4  $\mu\text{g/ml}$  BSA 包被 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,每个克隆重复 3 次。

1.3.2 DNA 序列测定 扩增以上阳性噬菌体克隆,用 PEG/NaCl 沉淀噬菌体,碘化钠溶解抽提噬菌体单链 DNA,琼脂糖电泳鉴定,送 Sangon 公司进行测序。

1.3.3 PAb-Cry2Aa 竞争抑制试验 4  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 包被 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{l}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜包被。次日弃去包被液,每孔加 200  $\mu\text{l}$  封闭液(0.1 mol/L 的  $\text{NaHCO}_3$ ,5 mg/ml BSA,0.02%  $\text{NaN}_3$ ),4  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。弃去封闭液,TBST 洗板 6 次,将培养好的 50  $\mu\text{l}$  GT 噬菌体上清液预先与 50  $\mu\text{l}$  不同浓度(用 TBST 配制浓度为 2.5 mg/ml 的 PAb-Cry2Aa,并进行 5 倍系列梯度稀释至 0.000 16 mg/ml,共设 7 个浓度梯度)的 PAb-Cry2Aa 充分混合,对照加入培养好的 50  $\mu\text{l}$  GT 噬菌体上清液和 50  $\mu\text{l}$  TBST 的混合液,每排分别加入 100  $\mu\text{l}$  的上述液体,3 次重复,室温结合 2 h,洗板 6 次后加入 100  $\mu\text{l}$  酶标抗-M13 单抗(1:5 000),室温结合 1 h,洗板 6 次。每孔加入 100  $\mu\text{l}$  ABTS 显色液,室温 15 min,测  $OD_{450}$ 。

1.3.4 利用间接竞争 ELISA 建立检测方法 间接竞争 ELISA 法:取 50  $\mu\text{l}$  GT 噬菌体上清液(含  $10^8$  个

噬菌体)与 14 种不同浓度的 Cry2Aa 毒素蛋白(用  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液配制成 20  $\mu\text{g/ml}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$  和 4  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 毒素,再对 4  $\mu\text{g/ml}$  Cry2Aa 毒素进行倍半稀释至 0.001 953  $\mu\text{g/ml}$ )混匀后先于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日将混合液加入包被有 Cry2Aa (4  $\mu\text{g/ml}$ )的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,TBST 洗板,加入二抗(HRP-羊抗 M13)孵育 1 h 后,显色,测  $OD_{450}$ 。以噬菌体上清液(不含 Bt 蛋白)反应孔为阳性值,其他为反应值,计算抑制率,抑制率( $I$ )=(阳性值-反应值)/阳性值 $\times 100\%$  [18]。

1.3.5 十二肽结合特异性测定 采用间接竞争 ELISA 法测定十二肽与 Bt 系列毒素蛋白之间的交叉反应率。间接竞争 ELISA 法:50  $\mu\text{l}$  噬菌体上清液分别与不同浓度的 Cry1Ac、Cry1B、Cry1C、Cry1F 蛋白标准品(用  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液配制成 9 种浓度:0.062 5  $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0  $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0  $\mu\text{g/ml}$ 、1.000 0  $\mu\text{g/ml}$ 、2.000 0  $\mu\text{g/ml}$ 、4.000 0  $\mu\text{g/ml}$ 、10.000 0  $\mu\text{g/ml}$  和 20.000 0  $\mu\text{g/ml}$ )混匀后先于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,次日将混合液加入事先包被有 Cry2Aa(4  $\mu\text{g/ml}$ )的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h 后,用 TBST 洗板,加入二抗(HRP-羊抗 M13)孵育 1 h 后,显色,测  $OD_{450}$ ,以噬菌体上清液(不含 Bt 蛋白)反应孔为阳性值,其他为反应值,计算抑制率,抑制率( $I$ )=(阳性值-反应值)/阳性值 $\times 100\%$ 。阻断剂分别为 Cry1Ac、Cry1B、Cry1C、Cry1F,计算各抑制物的  $IC_{50}$ 、交叉反应率( $CR$ )。 $CR_{\text{Cry1Ac}} = IC_{50 \text{ Cry1Ac}} / IC_{50 \text{ Cry2Aa}} \times 100\%$  [18]。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体十二肽库的筛选结果

通过 4 轮筛选,由产出投入比得知,特异性结合 Cry2Aa 的噬菌体得到有效富集(表 1)。

表 1 从噬菌体十二肽库亲和筛选 Cry2Aa 结合肽

Table 1 Affinity selection of Cry2Aa-binding peptides from Ph. D. -12 library

筛选轮数	投入噬菌体数量 (pfu)	产出噬菌体数量 (pfu)	产出投入比
第 1 轮	$1.5 \times 10^{12}$	$4.2 \times 10^5$	$2.8 \times 10^{-7}$
第 2 轮	$1.5 \times 10^{12}$	$6.7 \times 10^7$	$4.47 \times 10^{-5}$
第 3 轮	$1.5 \times 10^{12}$	$1.3 \times 10^9$	$8.67 \times 10^{-4}$
第 4 轮	$1.5 \times 10^{12}$	$7.1 \times 10^{10}$	$4.73 \times 10^{-2}$

产出投入比=产出噬菌体数量/投入噬菌体数量。

2.2 单克隆 ELISA 鉴定

对第 4 轮随机挑取的 20 个克隆进行单克隆 ELISA 鉴定,结果(图 1)显示:20 个克隆均为阳性克隆(阳性值/阴性值>2.1)。将 20 个克隆编号为 1~20。

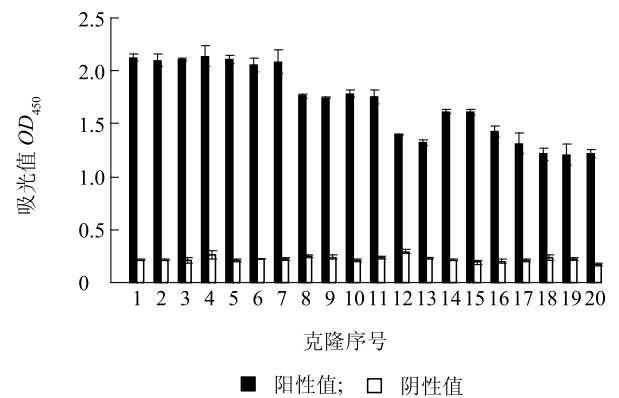


图 1 单克隆噬菌体 ELISA 鉴定抗 Cry2Aa 噬菌体抗体  
Fig. 1 Phage antibodies against Cry2Aa selected by monoclonal phage ELISA

2.3 噬菌体竞争性抑制 PAb-Cry2Aa 与 Cry2Aa 结合

在与 Cry2Aa 多抗(PAb-Cry2Aa)竞争 ELISA 试

验中,随着反应体系中 PAb-Cry2Aa 浓度的增加,抑制了 GT 噬菌体克隆与包被 Cry2Aa 毒素蛋白的结合,使其吸光值逐渐降低(图 2)。说明 GT 噬菌体克隆确实是针对 Cry2Aa 毒素蛋白某一表位产生的。

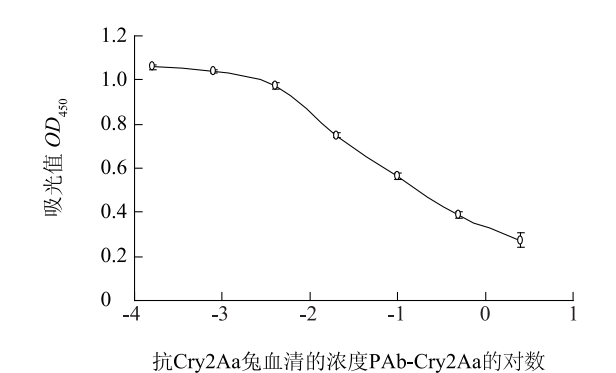


图 2 GT 噬菌体克隆与 PAb-Cry2Aa 竞争结合 Cry2Aa  
Fig. 2 Competitive binding of phage clone GT and PAb-Cry2Aa to Cry2Aa

2.4 噬菌体克隆展示肽 DNA 测序结果

对单克隆 ELISA 试验得到的 20 个阳性噬菌体克隆进行 DNA 测序并推导其相应的氨基酸序列,获得 8 条不同序列(表 2)。

表 2 第 4 轮阳性噬菌体克隆的外源 DNA 序列及相应氨基酸序列分析  
Table 2 The sequences of DNA and peptides of eluted phage in the fourth round

克隆序号	DNA 序列 (5'→3')	氨基酸序列
1	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
2	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
3	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
4	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
5	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
6	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
7	GGTACTCCTTGGCATCATCATCGTCATCTGATTGTT	GTPWHHRHLIV
8	GGGCATTCTCATCATTTGGCATCGGTTTTCTCTTAAT	GHSHHWHRFSLN
9	GGGCATTCTCATCATTTGGCATCGGTTTTCTCTTAAT	GHSHHWHRFSLN
10	GGGCATTCTCATCATTTGGCATCGGTTTTCTCTTAAT	GHSHHWHRFSLN
11	GGGCATTCTCATCATTTGGCATCGGTTTTCTCTTAAT	GHSHHWHRFSLN
12	TTTGCTCATCGTGGTCATTTCGGCTCATTTTTCGCAT	FAHRGSAHFSH
13	TTTGCTCATCGTGGTCATTTCGGCTCATTTTTCGCAT	FAHRGSAHFSH
14	TGGCATAAGCATCCTAGTAAGTCTATTGATTATCTG	WHKHPSKSIDYL
15	TGGCATAAGCATCCTAGTAAGTCTATTGATTATCTG	WHKHPSKSIDYL
16	TGGCATCATAAGCATGGTATGGCTAATGCCAGTCGT	WHHKHGMANASR
17	TGGCATCATAAGCATGGTATGGCTAATGCCAGTCGT	WHHKHGMANASR
18	ATGCATAAGCATCCGGTGCATATCGGGGTTTTGTT	MHKHPVHHRGFV
19	GGTTCGTGTCCTGGGTGTCCTTTGAATCTTCTTAGG	GSCPGCPLNLLR
20	CAGCTTGAGACGTTGGGGCGTGTTTGAGGATCCT	QLETLGRVLEDP



## 2.5 基于 GT 的间接竞争 ELISA 检测方法的建立

由结果(图3)得知,随着游离 Cry2Aa 浓度的增加,抑制率也增大,抑制率最高达 61.35%。游离 Cry2Aa 毒素蛋白对 GT 的抑制中浓度( $IC_{50}$ )为 1.139  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,最低检测限  $IC_{10}$  为 0.021 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,线性检测范围为 0.047 8 ~ 22.691 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $y = 23.091\lg x + 48.692, R^2 = 0.9963$ )。

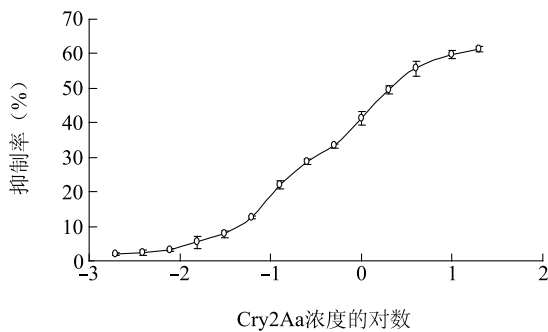


图3 间接竞争 ELISA 反应

Fig. 3 Indirect competitive ELISA

## 2.6 GT 克隆的结合特异性鉴定

由交叉反应结果(表3)显示,GT 特异性识别 Cry2Aa;对 Cry1C 的交叉反应率为 1.59%;对 Cry1Ac、Cry1B、Cry1F 的交叉反应率均小于 0.10%。

表3 噬菌体 GT 对 Cry1Ac、Cry1B、Cry1F 的交叉反应率

Table 3 The cross-reactivity of phage-GT with Bt toxin

供试毒素	半抑制浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	交叉反应率 (%)
Cry2Aa	1.312	100.00
Cry1Ac	>2 000.000	<0.10
Cry1B	>2 000.000	<0.10
Cry1C	824.000	1.59
Cry1F	>2 000.000	<0.10

## 3 讨论

噬菌体展示技术的发展具有很大优越性,它筛选容量大,效率高,亲和选择与生物学扩增能力有效结合,在获得亲和多肽或蛋白的同时也得到了其核酸编码序列。本研究通过对活化的 Cry2Aa 毒素采用随机 12 肽噬菌体展示文库进行 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的淘选,成功获得了针对 Cry2Aa 毒素特异性和亲和力较高的噬菌体多肽克隆。在噬菌体展示技

术中,筛选过程对于整个试验的成败起着至关重要的作用,在本试验的筛选过程中,为提高筛选的效率和最大程度获得高亲和力的噬菌体克隆,我们优化和整合了以下几种方法:①筛选过程中引入负筛选,可以有效减少与封闭蛋白结合噬菌体的克隆<sup>[19]</sup>;②保持 4 轮 Cry2Aa 的包被浓度不变,并在第 2 ~ 4 轮增加洗脱液中 Tween-20 的含量及洗涤次数,此手段可以减少非特异性和亲和力低的克隆<sup>[20]</sup>;③在胰蛋白酶(*Trypsin*)洗脱中加入游离的 Cry2Aa 毒素进行竞争洗脱,以确保获得高亲和力的噬菌体克隆<sup>[21]</sup>。在单克隆 ELISA 试验中,对第 4 轮产出的克隆随机挑选了 20 个进行鉴定,结果显示,阳性克隆达到了 100% (其中吸光值最高可达 2.0 以上),说明本试验采用的筛选方法可以十分有效地获得与 Cry2Aa 毒素特异性结合的高亲和力噬菌体克隆。

Bt 基因在转基因植物中表达水平在不同生长期不同部位差别很大,张青玲等测得 Cry2Aa 蛋白表达蛋白量为 33.5 ~ 120.0  $\text{ng}/\text{ml}$ <sup>[22]</sup>,本试验利用噬菌体多肽建立的 Cry2Aa 检测方法,最低检测限(21.1  $\text{ng}/\text{ml}$ ),基本能满足 Cry2Aa 蛋白检测的要求。但考虑到 Bt 蛋白提取存在损失,且本试验结果低于美国 EnvironLogix 公司转 Bt 基因 ELISA 试剂盒的最低检测限(1  $\text{ng}/\text{ml}$ )<sup>[22]</sup>,分析其原因,可能是单抗与十二肽对 Cry2Aa 蛋白的结合存在亲和力的差异以及检测方法设计的差异,本试验采用间接竞争法,而商品化试剂盒采用的是双抗夹心法,即非竞争法。非竞争检测方法无论是在最低检测限还是线性检测范围都比竞争法优越<sup>[7-8]</sup>。下一步的研究我们将改变检测方法,对已获得的十二肽进行突变,以期产生更高亲和力的多肽噬菌体,并且将单克隆抗体技术、噬菌体展示技术和基因工程技术相结合,制备多功能重组抗体,同时检测多种 Bt 毒素,降低检测成本。

本试验中筛选到的 Bt 蛋白特异结合的十二肽,也可为研究毒素与受体的相互作用,进一步探索抗性机制提供技术平台<sup>[12]</sup>。

## 参考文献:

- [1] DE MAAGD R A. *Bacillus thuringiensis*-Based products for insect pest control[M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 185-192.
- [2] DOMINGO J L, GINÉBORDONABA J. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants[J]. Environment

- International, 2011, 37(4): 734-742.
- [3] ANDOW D A, ZWAHLEN C. Assessing environmental risks of transgenic plants[J]. Ecology Letters, 2006, 9(2): 196-214.
  - [4] LU B R, XIA H. Environmental biosafety of transgenic plants; research and assessment of transgene escape and its potential ecological impacts[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(2): 186-194.
  - [5] SANVIDO O, ROMEIS J, GATHMANN A, et al. Evaluating environmental risks of genetically modified crops; ecological harm criteria for regulatory decision-making[J]. Environmental Science & Policy, 2012, 15(1): 82-91.
  - [6] HEUBERGER S, CROWDER D W, BRÉVAULT T, et al. Modeling the effects of plant-to-plant gene flow, larval behavior, and refuge size on pest resistance to *Bt* cotton[J]. Environmental Entomology, 2011, 40(2): 484-495.
  - [7] ZHANG X, LIU Y, ZHANG C, et al. Rapid isolation of single-chain antibodies from a human synthetic phage display library for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1B toxin[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 81: 84-90.
  - [8] WANG Y, ZHANG X, ZHANG C, et al. Isolation of single chain variable fragment (scFv) specific for Cry1C toxin from human single fold scFv libraries[J]. Toxicon, 2012, 60(7): 1290-1297.
  - [9] 华修德, 施海燕, 王鸣华. 噬菌体展示肽库技术及其在农药残留免疫分析中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(12): 3955-3961.
  - [10] LIU R, YU Z, HE Q H, et al. An immunoassay for ochratoxin A with out the mycotoxin[J]. Food Control, 2007, (18): 872-877.
  - [11] 李利红, 李常青. 转基因植物中 Bt 杀虫蛋白的重组噬菌体辅助检测[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(5): 728-731.
  - [12] 齐佳. 利用噬菌体展示技术筛选 Cry2Ab 毒素受体结合表位的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
  - [13] LI Y, WANG Y, ROMEIS J, et al. *Bt* rice expressing Cry2Aa does not cause direct detrimental effects on larvae of *Chrysoperla sinica*[J]. Ecotoxicology, 2013, 22(9): 1413-1421.
  - [14] WANG L H, DENG L H, LAI F X, et al. Optimization of the Cry2Aa Gene and Development of Insect-resistant and Herbicide-tolerant Photoperiod-sensitive Genic Male Sterile Rice[J]. Czech J Genet Plant Breed, 2014, 50(1): 19-25.
  - [15] MORSE R J, YAMAMOTO T, STROUD R M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope[J]. Structure, 2001, 9(5): 409-417.
  - [16] LENIN K, MARIAM M A, UDAYASURIYAN V. Expression of a cry2Aa gene in an acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* strain and toxicity of Cry2Aa against *Helicoverpa armigera*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(3): 273-278.
  - [17] ENGLISH L, ROBBINS H L, VON TERSCH M A, et al. Mode of action of CryIIA; a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 1994, 24(10): 1025-1035.
  - [18] 徐重新. 人源化抗苏云金芽胞杆菌 Bt (Cry1B) 毒素蛋白单链抗体的筛选, 表达及生物学活性测定[D]. 南京: 南京师范大学, 2013.
  - [19] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures[J]. Nature, 1992, 355(6363): 850-852.
  - [20] DE BRUIN R, SPELT K, MOL J, et al. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(4): 397-399.
  - [21] MOGHADDAM A, LØBERSLI I, GEBHARDT K, et al. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naive recombinant antibody libraries[J]. Journal of Immunological Methods, 2001, 254(1): 169-181.
  - [22] 张青玲, 李云河, 华红霞, 等. *Bt* 水稻田重要非靶标节肢动物暴露于 Cry2Aa 蛋白的程度分析[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(6): 1647-1651.

(责任编辑: 陈海霞)