

徐重新, 张存政, 何鑫, 等. 抗 Cry1F 毒素单链抗体的筛选及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1166-1172.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.05.035

## 抗 Cry1F 毒素单链抗体的筛选及初步应用

徐重新, 张存政, 何鑫, 张留娟, 张霄, 仲建锋, 刘媛, 谢雅晶, 刘贤金  
(江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所/江苏省食品质量安全重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地/农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 对扩增的 Tomlinson I 噬菌体抗体库进行 3 轮特异性富集, 挑取单菌落, 采用 ELISA、PCR 及测序比对分析鉴定阳性噬菌体单链抗体(scFv); 以宿主替换的方式将阳性噬菌体 scFv 基因导入 *Escherichia coli* HB2151 中进行可溶性表达, scFv 过柱纯化后, 建立针对 Cry1F 毒素的 IC-ELISA 检测方法。以 Cry1B、Cry1C、Cry1Ab、Cry1Ac 作为竞争抑制物, 分析 scFv 的特异性, 以 Cry1F 毒素在玉米中的添加回收试验评价检测方法的实用性。结果显示, 从第 3 轮富集库中筛选到了 11 株具有 Cry1F 毒素结合活性的噬菌体 scFv 菌株, 经 PCR 鉴定都含有目的条带, 对其中 2 株(H1、G9)进行测序, 证实为人源化的 scFv。选取 G9 号阳性噬菌体 scFv 进行可溶性表达, 纯化后收集到的 scFv 浓度为 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。建立的 IC-ELISA 检测方法检测灵敏度( $IC_{10}$ )为 5.99 ng/ml, 抑制中浓度( $IC_{50}$ )为 0.410  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 线性检测范围( $IC_{20} \sim IC_{80}$ )为 0.107 ~ 0.713  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。scFv(G9)对 Cry1B、Cry1C 具有一定结合活性, 交叉反应率分别达到了 20.92% 和 15.59%, 但不识别 Cry1Ab 和 Cry1Ac, 交叉反应率均低于 0.1%。添加回收试验结果表明, 基于 scFv(G9)建立的 IC-ELISA 检测方法稳定性和重复性都比较好。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌; Cry1F 毒素; 单链抗体; 酶联免疫分析

**中图分类号:** Q939.124 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)05-1166-07

## Screening and preliminary application of single-chain fragment variable (scFv) antibody against Cry1F toxin

XU Chong-xin, ZHANG Cun-zheng, HE Xin, ZHANG Liu-juan, ZHANG Xiao, ZHONG Jian-feng, LIU Yuan, XIE Ya-jing, LIU Xian-jin

(Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** A large phage antibody library (Tomlinson I) was employed to generate single-chain fragment variable (scFv) antibody against Cry1F toxin by affinity panning, and single colonies were randomly selected from amplified Tomlinson I after 3 rounds of panning. The positive clones were confirmed by ELISA, PCR, and sequencing. The positive phage scFv gene was introduced into *Escherichia coli* HB2151 by replacement of host for soluble expression. After elution and purification, protein scFv was achieved. An indirect competitive ELISA (IC-ELISA) was then de-

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371778); 农业推广项目[ TG(14)016 ]

作者简介: 徐重新(1987-), 男, 湖南永州人, 硕士, 研究实习员, 主要从事食品质量安全与控制技术研究。(E-mail) hhyxycx@163.com

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

veloped for the determination of Cry1F toxin using scFv as antibody. Totally eleven positive clones with distinct nucleotide sequences and intact *scFv* gene were confirmed to be specific for the Cry1F toxin, among which, H1 and G9 positive clones were the humanized *scFv*, which were confirmed by DNA sequencing. G9 positive phage was chosen for soluble expression and the concentration of purified scFv reached 256  $\mu\text{g/ml}$ . The concentration of Cry1F toxin spiked in corn sample ( $IC_{20} \sim IC_{80}$ ) detected by IC-ELISA ranged from 0.107 to 0.713  $\mu\text{g/ml}$ , and the median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) and detection limit ( $IC_{10}$ ) were 0.410  $\mu\text{g/ml}$  and 5.99 ng/ml, respectively. The cross-reactivities for Cry1B and Cry1C were 20.92% and 15.59%, and were less than 0.1% for Cry1Ab, Cry1Ac. The results suggested that the IC-ELISA developed in this study had a good repeatability and stability.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*; Cry1F toxin; single-chain fragment variable (scFv) antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性细菌,在芽胞形成时产生的 Bt 毒素对多种昆虫具杀虫活性<sup>[1-3]</sup>。自 Bt 被发现以来就一直作为生物农药用于各类害虫的防治,目前占据了微生物农药 95% 以上的市场<sup>[4]</sup>。Cry1F 毒素是 Bt 毒素的一种,主要用于防治地上鳞翅目害虫<sup>[5]</sup>。现有转 Cry1F 毒素的转基因作物主要为玉米和棉花,如抗虫玉米 TC1507、抗虫棉花 281-24-236 等,均已实现商业化生产和推广。目前 Cry1F 毒素的检测方法主要是基于单克隆抗体、多克隆抗体的免疫学检测方法,包括 ELISA 法<sup>[6-7]</sup>和商业化的免疫金标试纸条法等,另外还有采用表面等离子共振技术检测的报道<sup>[8]</sup>。

噬菌体抗体库技术是基于基因工程抗体改造技术发展而来的噬菌体表面展示技术。该技术的原理是将改造后的抗体基因克隆到丝状噬菌体噬菌粒载体上,随着噬菌粒串联共表达,使其展示在噬菌体衣壳蛋白质表面形成融合形式蛋白质抗体,从而将抗体的表型和基因型联系为一体,再通过与固相化抗原结合的特性进行筛选,获得抗原特异性的单链抗体 (scFv)<sup>[9]</sup>。噬菌体抗体库技术,避免了传统方法获取单克隆抗体、多克隆抗体所要经历的抗原乳化、动物免疫及采血等繁琐过程,通过抗体库富集筛选直接获得具有抗原结合活性的抗体,并可以进一步在基因水平上改造抗体的结构和功能,同时也能在原核、真核以及重组病毒中进行快速、大量的表达。Garet 等<sup>[10]</sup>利用噬菌体抗体库技术成功筛选到了具有抗海葵毒素活性的 scFv,并建立了免疫学检测方法。Zhang 等<sup>[11]</sup>也从噬菌体抗体库中筛选到了抗 Cry1B 毒素的 scFv,

并建立了针对 Cry1B 毒素的间接竞争 ELISA 检测方法,均取得了良好效果。本研究旨在利用噬菌体抗体库技术筛选具有 Cry1F 毒素结合活性的 scFv,并建立有别于单克隆抗体、多克隆抗体的新型基因工程改造抗体检测 Cry1F 毒素的免疫学检测方法,为转 Cry1F 毒素基因作物及其产品的检测探索新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Cry1F、Cry1C、Cry1B、Cry1Ab、Cry1Ac 毒素标样购自上海佑隆生物科技有限公司;Tomlinson I 噬菌体抗体库、辅助噬菌体 KM13、*Escherichia coli* TG1、*E. coli* HB2151 购自英国剑桥大学分子生物学实验室和蛋白质基因工程中心;酶标仪购自美国 Thermo 公司;酶标板购自美国 Corning 公司;anti-M13 [HRP] antibody、anti-His [HRP] antibody、His-Trap HP、超微量分光光度计 Nano Vue Plus spectrophotometer 购自美国 GE 公司;卡那霉素、氨苄青霉素购自美国 Sigma 公司;DNA marker、protein marker 购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 抗 Cry1F 毒素 scFv 的富集 将 500  $\mu\text{l}$  Tomlinson I 噬菌体抗体库菌液加入  $2 \times \text{TY-AG}$  培养基 (含终浓度 100  $\mu\text{g/ml}$  的 Amp、1% 的葡萄糖) 中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养到  $OD_{600}$  为 0.4。取 50 ml 菌液,加入  $1 \times 10^{12}$  PFU 辅助噬菌体 KM13 进行侵染,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,3 300 g 离心 10 min,弃上清液,沉淀用 100 ml  $2 \times \text{TY-AGK}$  培养基 (含终浓度 100  $\mu\text{g/ml}$  的 Amp、50  $\mu\text{g/ml}$  的 Kana、1% 的葡萄糖) 重悬,30  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。次日 3 300 g 离心 30 min,取上清液并加入 20 ml

PEG/NaCl 溶液,冰浴 1 h,3 300 g 离心 30 min,弃上清液,用 4 ml PBS 重悬沉淀,再以 11 600 g 离心 10 min,收集上清液,即为扩增的噬菌体抗体库,置于 4 ℃ 保存备用。取扩增的 Tomlinson I 库与固相化包被的 Cry1F 毒素共同孵育:第 1 轮将 4 ml 75 μg/ml (其后 2 轮依次为 50 μg/ml、10 μg/ml) Cry1F 毒素包被于细胞培养瓶底部,4 ℃ 过夜,次日用 1 ml PBS 清洗细胞培养瓶 3 次。取扩增的抗体库与 4 ml 3% 的 MPBS (PBS 溶液中含有 3% 的脱脂奶粉) 溶液充分混匀后加入细胞培养瓶,室温下缓慢摇动 1 h,再静置 1 h,倾去瓶中液体。以 PBST (PBS 溶液中含有 0.05% 的吐温-20) 洗瓶数次,然后加入 1 ml 胰蛋白酶 (Trypsin) 溶液洗脱特异性结合的噬菌体 scFv,收集后侵染 *E. coli* TG1 扩增进行下一轮筛选。如此 3 轮筛选即可富集与 Cry1F 毒素特异性结合的噬菌体 scFv。

**1.2.2 抗 Cry1F 毒素 scFv 的筛选及鉴定** 取第 3 轮富集的噬菌体 scFv 侵染 *E. coli* TG1, 37 ℃ 孵育 1 h 后,涂布于 TYE-AG (含终浓度 100 μg/ml 的 Amp、1.0% 的葡萄糖、1.5% 的琼脂) 上,37 ℃ 培养过夜。随机挑取长出的单菌落,接种到加有 2×TY-AG 培养基的 96 孔板中,37 ℃ 培养过夜。从板孔中吸出 2 μl 转接到新的 96 孔板中,37 ℃ 孵育 2 h,每孔加入 25 μl 辅助噬菌体,30 ℃ 孵育 2 h,1 800 g 离心 10 min,用 150 μl 2×TY-AK 重悬沉淀后 30 ℃ 培养过夜。次日 1 800 g 离心 30 min,取上清液加入到包被有 Cry1F 毒素 (浓度为 4 μg/ml) 的 96 孔板中,阴性对照为等量的 2×TY 培养基。37 ℃ 水浴 2 h,以 PBS 洗板 3 次,加入 100 μl anti-M13 [HRP] (1:1 000),37 ℃ 孵育 2 h,再次洗板,然后加入 100 μl 四甲基联苯胺 (Tetramethylbenzidine, TMB) 显色液,室温反应 15 min,以 50 μl 浓度为 1.96 g/ml 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用酶标仪测 OD<sub>450</sub> 值,阳性/阴性大于 2.1,即判断为阳性。

**1.2.3 抗 Cry1F 毒素 scFv 的可溶性表达** scFv 的可溶性表达及纯化方法参考文献 [11] 步骤进行。

**1.2.4 IC-ELISA 检测方法的建立及特异性分析** 取酶标板,板孔加入 100 μl 以 CBS 稀释的 Cry1F 毒素 (2.5 μg/ml),室温包被过夜。洗板 3 次后,加入 200 μl 3% 的 MPBS 溶液,37 ℃ 水浴封闭 2 h,再次洗板,每孔分别加入 50 μl 浓度为 2.0 μg/ml 的可溶

性 scFv 和 50 μl 浓度为 10 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、400 ng/ml、600 ng/ml、800 ng/ml 的 Cry1F 毒素标样混合液,37 ℃ 水浴 2 h,洗板加入 100 μl anti-His [HRP] (1:1 000),37 ℃ 水浴 2 h。洗板加入四甲基联苯胺显色液,室温反应 15 min,终止反应。测 OD<sub>450</sub>,以 Cry1F 毒素浓度为横坐标,以抑制率为纵坐标,建立 Cry1F 毒素的 IC-ELISA 检测方法。分别以 Cry1F 毒素的类似物:Cry1C、Cry1B、Cry1Ab、Cry1Ac 作为竞争抑制物,测定交叉反应率 (CR)<sup>[12]</sup>,评价该方法的抗原特异性。

**1.2.5 添加回收试验** 取玉米烘干磨成粉,过 100 目筛,称取 1 g 加入到 4 ml 试管中,共 3 管。随后加入 Cry1F 毒素,充分混匀,使其终浓度分别为 10 ng/g、100 ng/g、500 ng/g。每管加入 1 ml 样品提取液 (0.10 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6, 0.05% Tween-20),室温振荡 4 h,然后 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液保存待用。分别取上述 3 个浓度的提取物溶液,同 1 d 每个样品测 3 次,连续测 3 d,计算添加回收试验中 Cry1F 毒素的回收率 (回收率 = 检测值/理论值 × 100%) 及变异系数 (CV = 相对标准偏差/回收率)。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性多克隆噬菌体 scFv 的免疫分析

特异性多克隆噬菌体免疫分析,是采用非竞争 ELISA 法对原始抗体库和 3 轮富集筛选的次级库对抗原的整体亲和力进行鉴定。如图 1 所示,原始抗体库噬菌体的 ELISA 值 (OD<sub>450</sub>) 为 0.21,第 1 轮富集筛选后的次级库 OD<sub>450</sub> 为 0.34,第 2 轮富集筛选后的次级库 OD<sub>450</sub> 为 0.82,第 3 轮富集筛选后的次级库 OD<sub>450</sub> 为 1.50。结果表明,经过 3 轮富集筛选后,抗原特异性噬菌体得到有效富集,可用于抗 Cry1F 毒素 scFv 的筛选。

### 2.2 阳性单克隆的 ELISA、PCR 及测序鉴定

经第 3 轮筛选后,随机挑取噬菌体单克隆进行单克隆噬菌体 ELISA 鉴定,以阳性值/阴性值 (P/N) 大于 2.1 为阳性标准,结果筛选出 11 个阳性单克隆 (图 2)。经通用引物 (LMB3: 5'-CAGGAAA-CAGCTATGAC-3'; pHEN: 5'-CTATGCGGCCCAT-TCA-3') 进行 PCR 鉴定 (图 3),11 个阳性单克隆均含有 935 bp 大小的目的基因条带。选取 H1 和 G9 阳性单克隆菌种进行 DNA 测序 (图 4),经 NCBI 比

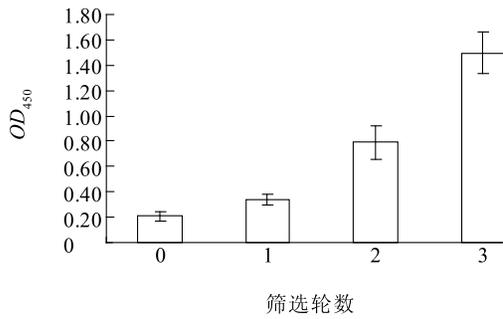


图1 3轮筛选的多克隆噬菌体免疫分析结果

Fig. 1 Immunoassay of polyclonal phage after three rounds of binding

对分析,均具有3个完整的重链可变区(H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3)、轻链可变区(L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3),及1条重、轻链之间的Link序列,由此确认为人源化的scFv基因。H1和G9的scFv蛋白氨基酸序列仅在L-CDR1区存在2个氨基酸的差异,我们初步推断L-CDR1区可能是影响scFv抗原结合活性的关键位点。

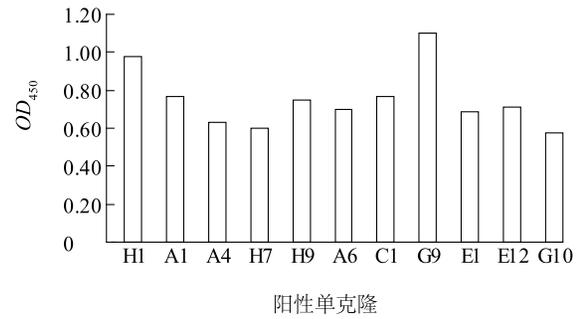


图2 ELISA 筛选阳性单克隆

Fig. 2 ELISA for screening positive monoclones

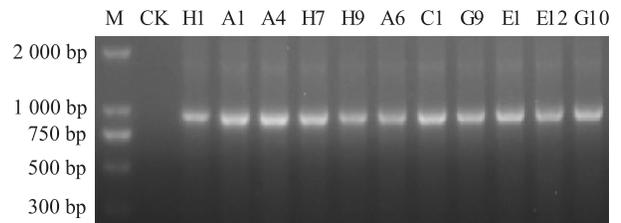
M: DNA marker; CK: *E. coli* TG1; H1 ~ G10: 阳性克隆。

图3 11株阳性克隆的PCR鉴定

Fig. 3 PCR identification of 11 positive clones

|       |                                            | H-CDR1                   |                              |
|-------|--------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| H1.   | MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA                     | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS    | CAASGFTFSSYAMSWVR 60         |
| G9.   | MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA                     | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS    | CAASGFTFSSYAMSWVR 60         |
| ***** |                                            |                          |                              |
|       |                                            | H-CDR2                   |                              |
| H1.   | QAPGKGLEWVSTIANNGGATGY                     | ADSVKGRFTISRDN           | SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 120 |
| G9.   | QAPGKGLEWVSTIANNGGATGY                     | ADSVKGRFTISRDN           | SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK 120 |
| ***** |                                            |                          |                              |
|       |                                            | H-CDR3 -                 | Link - - - - -               |
| H1.   | <i>SGAYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG</i>     | <i>STDIQMTQSPSSLSASV</i> | <i>GDRVTITSRAL 180</i>       |
| G9.   | <i>SGAYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG</i>     | <i>STDIQMTQSPSSLSASV</i> | <i>GDRVTITCRAS 180</i>       |
| ***** |                                            |                          |                              |
|       |                                            | L-CDR1 - -               | L-CDR2                       |
| H1.   | <i>QSISYLNWYQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFS</i> | <i>SGSGTDFLT</i>         | <i>TISSLQPEDFATY 240</i>     |
| G9.   | <i>QSISYLNWYQKPGKAPKLLIYSASSLQSGVPSRFS</i> | <i>SGSGTDFLT</i>         | <i>TISSLQPEDFATY 240</i>     |
| ***** |                                            |                          |                              |
|       |                                            | L-CDR3                   | His-tag                      |
| H1.   | <i>YCQQAAYPSTFGQRTNVEIKRAAAHHHHHHGAAE</i>  | <i>QKLISEEDLN</i>        | <i>GAASTP 291</i>            |
| G9.   | <i>YCQQAAYPSTFGQRTNVEIKRAAAHHHHHHGAAE</i>  | <i>QKLISEEDLN</i>        | <i>GAASTP 291</i>            |

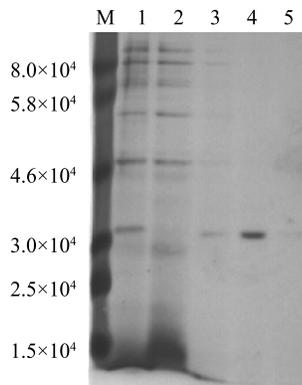
斜体表示重、轻链可变区和 Link 序列。

图4 H1、G9 阳性重组噬菌体 scFv 的氨基酸序列

Fig. 4 The amino acid sequences of positive recombinant phage scFv of H1 and G9

### 2.3 scFv 的可溶性表达

将 G9 阳性噬菌体 scFv 通过宿主替换的方式导入到 *E. coli* HB2151 中进行可溶性表达, 收集培养上清液过 anti-His-Tag 亲和层析柱纯化, 采用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白质。如图 5 所示, 通过不同浓度 (50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L) 的咪唑洗脱缓冲液进行梯度洗脱, 上清液中杂蛋白质被逐级洗脱下来, 目的蛋白质获得纯化, 最后在 400 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液 (泳道 4) 中收集到了大量纯化的 scFv 蛋白质, 定容至 1 ml, 经微量分光光度计测得目的蛋白质浓度为 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。由此说明抗 Cry1F 毒素的 scFv (G9) 在 *E. coli* HB2151 中的可溶性表达获得成功, 可进行下一步活性测定及抗原特异性分析。



M: Marker; 1 ~ 5: 分别为 50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱收集液。

图 5 scFv 经不同浓度洗脱液洗脱纯化后的 SDS-PAGE 电泳  
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of scFv after elution and purification

### 2.4 IC-ELISA 检测法的建立及特异性分析

如图 6 所示, 以可溶性表达的 scFv (G9) 为检测抗体, 采用 IC-ELISA 法, 建立针对 Cry1F 毒素的标准抑制曲线。其线性回归方程为  $Y = 0.0990x + 9.4070$  ( $R^2 = 0.9892$ ), 其中,  $Y$  为抑制率 (%),  $x$  为 Cry1F 毒素浓度 ( $\text{ng}/\text{ml}$ )。计算得到该检测方法的检测灵敏度 ( $IC_{10}$ ) 为 5.99  $\text{ng}/\text{ml}$ , 抑制中浓度 ( $IC_{50}$ ) 为 0.410  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 线性检测范围 ( $IC_{20} \sim IC_{80}$ ) 为 0.107 ~ 0.713  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Cry1B、Cry1C、Cry1Ab 和 Cry1Ac 作为 Cry1F 毒素的类似物, 在建立的 IC-ELISA 法中测得交叉抑

制试验结果如表 1 所示, scFv (G9) 对 Cry1C、Cry1B 均具有一定的识别能力, 交叉反应率分别达到了 20.92% 和 15.59%, 而对 Cry1Ab、Cry1Ac 交叉反应率均低于 0.1%, 识别能力几乎可以忽略。

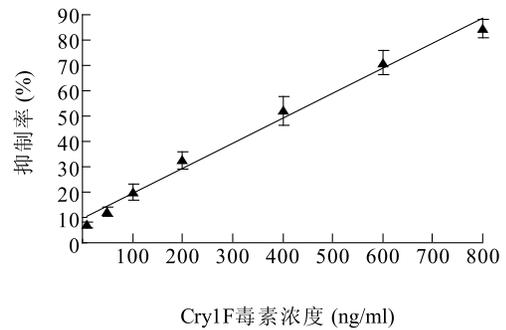


图 6 IC-ELISA 法检测 Cry1F 毒素的标准抑制曲线  
Fig. 6 Standard inhibition curve for Cry1F toxin by IC-ELISA

表 1 Cry1F 毒素类似物的交叉反应

Table 1 Cross reactivity between scFv and Cry1F toxin analogous

| 供试毒素   | 抑制中浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) | 交叉反应率 (%) |
|--------|-----------------------------------|-----------|
| Cry1F  | 0.41                              | 100.00    |
| Cry1C  | 1.96                              | 20.92     |
| Cry1B  | 2.63                              | 15.59     |
| Cry1Ab | >5 000                            | <0.10     |
| Cry1Ac | >8 000                            | <0.10     |

### 2.5 Cry1F 毒素在玉米中的添加回收

为测试基于 scFv (G9) 的 IC-ELISA 检测法的实用性, 我们在该方法线性检测范围 ( $IC_{20} \sim IC_{80}$ ) 内, 分别做了 500  $\text{ng}/\text{g}$ 、100  $\text{ng}/\text{g}$ 、10  $\text{ng}/\text{g}$  3 个 Cry1F 毒素浓度水平在玉米中的添加回收试验。结果如表 2 所示, 3 个样品浓度的批内回收率为 85.43% ~ 94.71%, 变异系数为 6.43% ~ 9.13%; 批间回收率为 82.26% ~ 91.61%, 变异系数为 7.99% ~ 9.00%。批内、批间试验均满足仪器检测的稳定性和重复性的要求。

## 3 讨论

Tomlinson I 噬菌体抗体库表达载体 pIT2 是由丝状噬菌体改造而来的一种噬菌粒, 在多克隆位点与 gIII 蛋白质编码区之间有 1 个 His-tag 序列和琥珀

表 2 玉米中 Cry1F 毒素的 IC-ELISA 检测法批内、批间的添加回收率和变异系数

Table 2 Recoveries and coefficients of variation of intra- and inter-assays for detection of Cry1F toxin by IC-ELISA in corn

| 添加浓度<br>(ng/g) | 批内         |          | 批间         |          |
|----------------|------------|----------|------------|----------|
|                | 回收率 (%)    | 变异系数 (%) | 回收率 (%)    | 变异系数 (%) |
| 500            | 89.69±5.77 | 6.43     | 84.99±7.65 | 9.00     |
| 100            | 85.43±6.57 | 7.69     | 82.26±6.79 | 8.25     |
| 10             | 94.71±8.65 | 9.13     | 91.61±7.32 | 7.99     |

终止密码子(UAG)。当携带 *scFv* 基因的噬菌粒在琥珀突变抑制基因的宿主 (*E. coli* TG1) 中表达时,UAG 被译读为谷氨酸,*scFv* 与 gⅢ 蛋白质融合,在辅助噬菌体的营救下,组装成展示在噬菌体衣壳蛋白质表面的融合形式的 *scFv*;当携带 *scFv* 基因的噬菌粒在非琥珀突变抑制的宿主 (*E. coli* HB2151) 中时,UAG 则被译读为终止密码子,*scFv* 终止于 His-tag,形成可溶性的 *scFv*-His-tag 蛋白质,并被分泌到胞外<sup>[13]</sup>。本研究正是利用 Tomlinson I 噬菌体抗体库的这个特点,先从库中筛选具有 Cry1F 毒素结合活性的展示型噬菌体 *scFv*,然后通过宿主替换的方式(由 *E. coli* TG1 替换为 *E. coli* HB2151),直接将展示型的噬菌体 *scFv* 转为能可溶性表达的 *scFv*-His-tag 蛋白质,并通过 His 标签进行纯化收集和间接活性测定。该方法跳过了外源基因在表达时需要“构建重组载体→化转感受态细胞”的繁琐过程,大大提高了获取 *scFv* 蛋白质的效率。以可溶性 *scFv* (G9) 为检测抗体建立的 IC-ELISA 法检测灵敏度 ( $IC_{10}$ ) 为 5.99 ng/ml,比商业化的转 *Bt* 基因毒素 ELISA 检测试剂盒 ( $IC_{10}$  为 0.5 ng/ml)<sup>[14]</sup> 的灵敏度约低 10 倍。由此说明,初筛的 *scFv* 抗原结合活性与单克隆抗体、多克隆抗体还存在一定差距,不过,在后期研究中可以考虑采用不同的表达系统(昆虫细胞表达<sup>[15]</sup>)和抗体亲和力成熟改造技术(易错 PCR<sup>[16]</sup>、定点突变<sup>[17]</sup>、链置换<sup>[18]</sup>等),进一步提高 *scFv* 的亲合活性,以达到检测所需灵敏度的要求。从抗原特异性来看,因为选取的对象 (Cry1B、Cry1C、Cry1Ab、Cry1Ac) 少,并不能有效说明 *scFv* (G9) 是否具有广谱识别能

力,后期可以扩大抗原类似物种类(如:Cry1Aa、Cry1D、Cry1E、Cry2Aa、Cry2Ab、Cry3A、Cry3A、Cry34/Cry35等)进行交叉抑制试验,并从中摸索规律,为 *scFv* 的广谱识别检测改造提供指导。

#### 参考文献:

- [1] SCHNEPF E, CRICKMORE N, VAN R J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins [J]. *Microbiol Mol Biol*, 1998, 62(3):775-797.
- [2] 韩光杰,孙俊,李传明,等. 苏云金芽孢杆菌原生质体的制备及大质粒转化[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(11):37-40.
- [3] 孙钰航,刘艳杰,李海涛,等. 辽宁千山地区含 *cry8* 类基因的苏云金芽孢杆菌的分离、克隆与表达[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(10):28-32.
- [4] 关雄,蔡峻. 我国苏云金杆菌研究 60 年[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(3):459-465.
- [5] 姜松男,丛斌,马晓慧,等. 转 *Bt Cry1F* 基因抗虫玉米对米蛾生长发育的影响[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(3):509-511.
- [6] SHAN G, EMBREY S K, HERMAN R A, et al. Cry1F protein not detected in soil after three years of transgenic Bt corn (1507 corn) use[J]. *Environ Entomol*, 2008, 37(1):255-62.
- [7] 白树雄,张洪刚,葛星,等. 转 *Cry1F* 基因玉米花粉对腰带长体蜜蜂存活和繁殖的影响[J]. *植物保护*, 2011, 37(6):82-85.
- [8] 曾倡,张鹏,黄新. 利用表面等离子共振传感器检测苏云金芽孢杆菌 *cry1F* 蛋白[J]. *生物技术通讯*, 2012, 23(6):851-853.
- [9] WILLIAM G, WILLATS T. Phage display: practicalities and prospects[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50: 837-854.
- [10] GARET E, CABADO A G, VIEITES J M, et al. Rapid isolation of single-chain antibodies by phage display technology directed against one of the most potent marine toxins: palytoxin[J]. *Toxicon*, 2010, 55:1519-1526.
- [11] ZHANG X, LIU Y, ZHANG C Z, 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.
- [12] ZHU G N, GUI W J, ZHENG Z T, et al. Synthesis and identification of artificial antigen for imidacloprid [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(4): 307-312.
- [13] 徐重新, 张存政, 刘贤金, 等. 人源化抗 Cry1B 毒素蛋白单链抗体的原核表达与生物学活性测定 [J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(3): 47-52.
- [14] 谢小波, 舒庆尧. 用 Envirologix Cry1Ab/Cry1Ac 试剂盒快速测定转基因水稻 Bt 杀虫蛋白含量的研究 [J]. *中国农业科学*, 2001, 34(5): 465-468.
- [15] WANG H, GUO Z D, LI Z, et al. Effects of various muscarinic ligands on M2AChR-Gi1alpha fusion protein expressed in sf9 insect cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2002, 23(3): 230-236.
- [16] RIANO-UMBARILA L, CONTRERAS-FERRA G. Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(8): 6143-6151.
- [17] BARDERAS R, DESMET J, PETER T, et al. Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(26): 9029-9034.
- [18] KRAMER K. Evolutionary affinity and selectivity optimization of a pesticide-selective antibody utilizing a hapten-selective immunoglobulin repertoire [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36(22): 4892-4898.

(责任编辑: 袁 伟)