

王 耘, 武爱华, 刘贤金, 等. 亲和短肽用于快速检测转基因蛋白 Cry3Bb[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 690-694.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.030

## 亲和短肽用于快速检测转基因蛋白 Cry3Bb

王 耘<sup>1</sup>, 武爱华<sup>2</sup>, 刘贤金<sup>2</sup>, 谢雅晶<sup>2</sup>, 闫 娜<sup>1</sup>, 张存政<sup>2</sup>

(1. 金陵科技学院园艺学院, 江苏 南京 210038; 2. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所/农业部食品质量安全监控重点开放实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 本研究利用竞争洗脱法筛选与 Cry3Bb 毒素具有亲和力的特异性短肽, 以此建立间接竞争酶联免疫吸附检测方法(IC-ELISA)。经过4轮淘选、富集, 获得与靶蛋白具有较高亲和力的 B10 克隆(ACIHSPTALCGGG)。所建立的检测方法稳定性较好, 变异系数在5%以内; 线性检测范围为 0.03~29.95  $\mu\text{g/ml}$ , 线性回归方程为 ( $Y=20.044x+50.407, R^2=0.9834$ ), 检测限为 0.0096  $\mu\text{g/ml}$ , 在玉米样品中提取回收率为 92.26%~101.22%。本研究建立的 ELISA 检测方法为粮食中 Cry3Bb 蛋白的定量检测提供了有效的手段, 在转基因产品的检验检疫中有较高的应用价值。

**关键词:** Cry3Bb 毒素; 转基因植物; 噬菌体展示肽; 间接竞争 ELISA

**中图分类号:** X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0690-05

## Quantitative detection of Cry3Bb protein in transgenic plants by phage-displayed peptide

WANG Yun<sup>1</sup>, WU Ai-hua<sup>2</sup>, LIU Xian-jin<sup>2</sup>, XIE Ya-jing<sup>2</sup>, YAN Na<sup>1</sup>, ZHANG Cun-zheng<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China; 2. 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)

**Abstract:** This study aimed to develop a quantitative indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA) for detection of Cry3Bb protein in corn. A Ph.D.-C7C phage display peptide library was used to screen peptides specifically binding Cry3Bb. An phage clone, B10(ACIHSPTALCGGG), showed higher affinity and specificity to Cry3Bb *in vitro* compared to other clones. The newly developed ELISA exhibited good stability with the coefficient of variation less than 5%. In the concentration range of 0.03~29.95  $\mu\text{g/ml}$ , the linear equation  $Y=20.044x+50.407, R^2=0.9834$ , was regressed with the detection limit of 0.0096  $\mu\text{g/ml}$ . The recoveries of Cry3Bb in corn extract ranged from 92.26% to 101.22%. The established IC-ELISA provides an effective way to quantitatively detect Cry3Bb protein in corn.

**Key words:** Cry3Bb toxin; transgenic plant; phage-displayed peptide; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA)

收稿日期: 2016-09-28

**基金项目:** 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20150114); 江苏省高校自然科学研究项目(14KJB210004); 金陵科技学院博士启动项目(jit-6-201518); 金陵科技学院校级科研基金孵化项目(C140501)

**作者简介:** 王 耘(1985-), 女, 江苏南京人, 博士, 讲师, 主要从事农产品安全检测与质量控制。(E-mail) wangyun@jit.edu.cn

近十年, *Bt* 转基因作物商品化种植推广迅速<sup>[1]</sup>, 研究发现长期大面积种植后会造成杀虫基因逃逸, 生物多样性下降以及对非目标生物的间接危

害等风险<sup>[2-3]</sup>,同时对土壤和水体生态系统也存在潜在的风险<sup>[4-5]</sup>,因此,在进行转基因作物研究、开发和商业化的同时,必须建立恰当的方法对粮食及环境中转基因成分进行快速鉴定与检测。

针对 Bt Cry1Ac/Ab 毒素的抗体制备及 ELISA 检测方法,国内外已有大量报道<sup>[6-7]</sup>,市场上用于检测 Bt 毒素的试剂盒大多数是采用以多克隆或单克隆抗体为检测元件,其免疫过程比较繁琐,且受个体和免疫过程的影响较大。噬菌体展示技术可以克服上述缺点,该技术是对含有数以亿计克隆的随机片段进行快速高通量的筛选,获得的阳性克隆可被用于分子识别、快速检测试剂开发等领域<sup>[8-9]</sup>。目前利用该技术获得的针对 Cry1 类毒素蛋白的单链抗体和多肽在 Bt 毒素检测方面也已得到初步应用<sup>[10-11]</sup>。

Cry3 类毒素对鞘翅目害虫有特殊的防治效果<sup>[12]</sup>,而被广泛使用,但是对于 Cry3 类毒素的检测试剂目前研究并不普遍。本研究利用噬菌体展示技术筛选 Cry3Bb 特异亲和肽段,用该肽段代替 ELISA 检测中的特异性抗体,建立 Cry3Bb 毒素竞争 ELISA 检测方法,用于粮食中毒素蛋白的检测,为进一步简化 Bt 毒素的检测技术和相关免疫检测试剂盒的生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和材料

Ph.D.-C7C 噬菌体展示肽库、受体菌 *Escherichia coli* ER 2738/-96 g III 测序引物: 5'-HOCCTCAT-AGTTAGCGTAACG-3',购于 NEB 公司,HRP-M13 抗体购自美国 Abcam 公司,Cry3Bb 毒素购自上海佑隆生物公司,酶标仪购于美国 Thermo 公司,酶标板购于美国 Corning 公司,其他化学试剂均为分析纯产品。

### 1.2 Cry3Bb 亲和肽的筛选

主要参照 Ph.D.-C7C 噬菌体展示肽库试剂盒使用手册进行淘选。以 BSA 为负筛选靶标包被 6 孔板进行预筛选,再与活化的 Cry3Bb 毒素结合,并以竞争洗脱方式进行洗脱。第 1 轮洗涤条件是 0.1% 的 Tween20 洗 10 次,第 2 轮和第 3 轮用 0.5% 的 Tween20 各洗 20 次,第 4 轮洗涤 25 次。经 4 轮淘选和扩增,从噬菌斑中随机挑取 20 个单克隆,菌液 DNA 测序由上海生工生物技术公司完成,引物为-96gIII。使用 DNAMAN 和 Swiss 数据库序列进行分析。

### 1.3 噬菌体捕获的 ELISA 检测方法

将测序结果不同的环七肽噬菌体克隆进行扩增、PEG 纯化,测定滴度。靶蛋白用 CBS 进行稀释,以 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  包被酶标板,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,BSA 作为阴性对照。次日封闭 2 h,每孔分别加入  $10^{11}$  PFU 噬菌体室温孵育 1 h,洗涤后加入 HRP-M13 抗体(1 : 5 000 稀释)结合 1 h,洗去未结合的抗体,加入底物 TMB 显色,测定吸光值  $A_{450}$ 。

### 1.4 IC-ELISA 检测方法的建立及特异性分析

采用棋盘滴定确定 Cry3Bb 的最佳包被浓度以及阳性噬菌体克隆的最佳稀释倍数。按最佳 Cry3Bb 浓度包被微孔,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,MPBS 封闭后,加入孵育过夜的毒素与多肽的混合物(取 50  $\mu\text{l}$  最佳稀释倍数的噬菌体阳性克隆与 50  $\mu\text{l}$  Cry3Bb 毒素混匀,毒素起始浓度为 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,4 倍梯度稀释,共 8 个梯度),同时以 BSA 作为阴性对照,加入 HRP 标记抗 M13,TMB 显色后测定  $A_{450}$  值。做 3 次平行重复试验,计算抑制率。抑制率计算方法:抑制率 = (抑制前  $A_{450}$  - 抑制后  $A_{450}$ ) / 抑制前  $A_{450}$   $\times 100\%$ 。分别以类似物 Cry1C、Cry1B、Cry1Ab 作为竞争抑制物,测定交叉反应率(CR),评价该方法的抗原特异性。

### 1.5 实际样品检测

鉴定空白玉米样品并进行添加回收<sup>[10]</sup>,加入 Cry3Bb 毒素的终浓度分别为 50 ng/g、500 ng/g、5 000 ng/g。分 3 批添加,每次测定 3 次,计算添加回收试验中 Cry3Bb 毒素的回收率(回收率 = 检测值/理论值  $\times 100\%$ )及变异系数( $CV$  = 相对标准偏差/回收率)。

### 1.6 数据分析

采用 SPSS 软件进行数据处理,采用 Excel 进行克隆亲和力特异性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性环 7 肽的筛选

以 Cry3Bb 为靶分子,使噬菌体表面展示的随机多肽与之结合。第 4 轮筛选后特异性噬菌体得到明显富集(表 1)。

从第 4 轮产物中随机选取 20 个噬菌体单克隆,并以野生型噬菌体作为对照,将其调整到同一滴度后进行 ELISA 检测,发现有 13 个噬菌体单克隆与 Cry3Bb 结合性较强(图 1)。

表 1 Cry3Bb 筛选对噬菌体多肽的富集效应

Table 1 Selective enrichment of phage peptides against Cry3Bb

| 筛选轮数 | 投入噬菌体数量 (PFU)      | 产出噬菌体数量 (PFU)   | 产出投放比               |
|------|--------------------|-----------------|---------------------|
| 1    | $1.5\times10^{11}$ | $5.5\times10^4$ | $3.67\times10^{-7}$ |
| 2    | $2.0\times10^{11}$ | $3.7\times10^5$ | $1.85\times10^{-6}$ |
| 3    | $1.8\times10^{11}$ | $2.5\times10^7$ | $1.39\times10^{-4}$ |
| 4    | $1.9\times10^{11}$ | $6.9\times10^8$ | $3.63\times10^{-3}$ |

2.2 特异性多肽的序列分析

将筛选获得的 13 个单克隆噬菌体进行核苷酸序列测定,结果表明,1、3、5、10、12、13、17、18、19、20 号这 10 个噬菌体展示的多肽氨基酸序列一致,为 ACIHSPTALCGGG,而 2、6、9 号噬菌体的多肽氨基酸序列没有同源性。

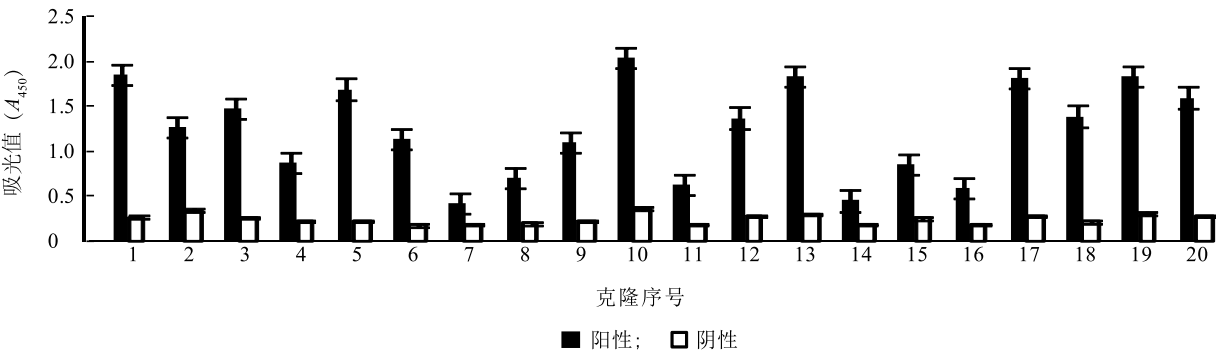


图 1 单克隆噬菌体 ELISA 鉴定 Cry3Bb 噬菌体多肽  
Fig.1 Phage peptides against Cry3Bb detected by ELISA

2.3 测序肽段的结合鉴定

选择编码不同的多肽片段的 2、6、9、10 号噬菌体扩增后,调整滴度至  $1.0\times10^{11}$  PFU,进行抗原包被浓度梯度检测。结果(图 2)表明,2、6、10 号噬菌体吸光度随抗原包被浓度的增加而增大,但是 2 号和 6 号噬菌体多肽的吸光值变化幅度较小,而 10 号噬菌体的吸光值变化幅度为 2.029,表明该噬菌体对抗原浓度变化的反应灵敏度较高,因此,以 10 号克隆为对象建立检测方法,命名为 B10。

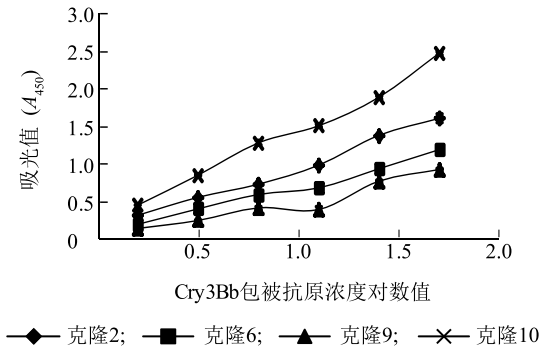


图 2 抗原浓度梯度条件下多肽酶联免疫吸附检测结果  
Fig.2 Detection phage affinity to antigen concentration gradient by ELISA

2.4 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

由图 3 得知,随着游离 Cry3Bb 浓度的增加,抑制率也增大,最高抑制率达 86.17%。该方法的抑制中浓度 ( $IC_{50}$ ) 为  $0.954\ 0\ \mu\text{g/ml}$ ,最低检测限 ( $IC_{10}$ ) 为  $0.009\ 6\ \mu\text{g/ml}$ ,线性检测范围为  $0.03\sim 29.95\ \mu\text{g/ml}$  ( $Y=20.044x+50.407, R^2=0.983\ 4$ )。

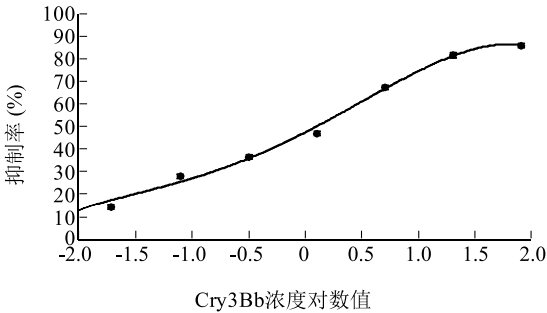


图 3 IC-ELISA 法检测 Cry3Bb 毒素的标准抑制曲线  
Fig.3 Standard inhibition curve for Cry3Bb toxin by IC-ELISA

表 2 显示, B10 对 Cry1Ab、Cry1B、Cry1C 的交叉反应率均小于 0.10%,表明该多肽有较好的特异性。

表 2 B10 对 Cry1Ab、Cry1B、Cry1C 的交叉反应率

Table 2 The cross-reactivity of B10 to Bt toxins

| 供试毒素   | 抑制中浓度<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | 交叉反应率<br>(%) |
|--------|-------------------------------|--------------|
| Cry3Bb | 0.954                         | 100.0        |
| Cry1Ab | >1 000.000                    | <0.1         |
| Cry1B  | >1 000.000                    | <0.1         |
| Cry1C  | >1 000.000                    | <0.1         |

## 2.5 实际样品的检测

玉米中的添加回收试验进一步验证了 ELISA 检测法的实用性。采自金陵科技学院实验田的玉米样品提取液未检测到 Cry3Bb 蛋白,在线性检测范围内,分别做了 5 000 ng/g、500 ng/g、50 ng/g 3 个浓度在玉米中的添加回收试验。

结果如表 3 所示,3 个样品浓度的批内回收率为 95.43%~99.15%,变异系数为 3.13%~3.45%;批间回收率为 92.26%~101.22%,变异系数为 3.70%~4.25%。批内和批间试验结果均满足检测稳定性和重复性的要求。

表 3 玉米中 Cry3Bb 毒素蛋白含量的检测

Table 3 Detection of Cry3Bb protein content in spiked samples

| 添加浓度<br>(ng/g) | 批内          |            | 批间          |            |
|----------------|-------------|------------|-------------|------------|
|                | 变异系数<br>(%) | 回收率<br>(%) | 变异系数<br>(%) | 回收率<br>(%) |
| 5 000          | 3.13        | 95.43      | 3.70        | 100.33     |
| 500            | 3.24        | 98.77      | 3.99        | 92.26      |
| 50             | 3.45        | 99.15      | 4.25        | 101.22     |

## 3 讨论

中国转基因植物种植面积不断扩大,虽然目前没有足够证据能证明该产品对人类健康造成危害,但是市面上包括玉米泥等加工食品中已被检测出有转基因成分,人们仍然对转基因粮食的食用和生态安全隐患存在担忧,因此建立有效的检测方法是当务之急。已有 40 多个国家和地区开始建立转基因产品市场准入和标识管理制度,因此转基因检测技术在农产品监管中发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。

噬菌体展示肽库是在噬菌体外壳蛋白基因中插入编码外源性多肽的 DNA 序列的重组噬菌体库,

其产生的数十亿种随机肽段与噬菌体外壳蛋白以融合形式表达于噬菌体表面。近年来,噬菌体展示随机肽库被广泛应用在蛋白表位的筛选、受体定位等方面的研究<sup>[14-16]</sup>。本研究的目的是运用噬菌体肽库筛选出 Cry3Bb 毒素特异性结合肽,探究其应用于 Cry3Bb 毒素检测中的可能性。

本研究利用负筛选的方式,经过 4 轮筛选,特异性多肽得到有效富集,进一步在抗原浓度梯度测试中,B10 噬菌体展示多肽显示出与 Cry3Bb 有较强的结合力,表明针对 Cry 毒素进行肽库筛选获得结合靶标这一方法是可行的。于志晶等<sup>[17]</sup>研究发现转基因作物中毒素蛋白在不同组织及不同生长期表达量都不同(0.5~6.0  $\mu\text{g/g}$ ),因此需要实时监控毒素表达情况,本研究建立的 IC-ELISA 基本满足检测需要。但是美国 EnviroLogix 公司转 Cry3Bb 基因检测试纸的灵敏度为 0.5%,而本研究最低检测限为 0.009 6  $\mu\text{g/ml}$ ,两者间还存在一定差距,主要原因有两点:单抗与 Cry3Bb 蛋白的亲合力较高;商品化试剂盒采用的是双抗夹心法,下一步的研究我们将利用定点突变等技术改善以上不足,并优化检测方法提高检测灵敏度。本试验利用筛选到的特异结合七肽建立了 Cry3Bb 蛋白转基因成分检测方法,为非传统视角下保障粮食安全提供了新的技术平台,具有较高的实用价值。

## 参考文献:

- [1] JAMES C. 2015 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J]. 中国生物工程杂志,2016,36(4):1-11.
- [2] 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.
- [3] DOMINGO J L,BORDONABA J G. A literature review on the safety assessment of genetically modified plants[J]. Environment International,2011,37(4):734-742.
- [4] LIU Y,LI J,LUO Z, et al. The fate of fusion Cry1Ab/1Ac proteins from Bt -transgenic rice in soil and water[J]. Ecotoxicology & Environmental Safety,2015,124:455-459.
- [5] JIANG Y,LING L,ZHANG L, et al. Transgenic Bt, (Cry1Ab/Ac) rice lines with different genetic backgrounds exhibit superior field performance under pesticide-free environment[J]. Field Crops Research,2016,193:117-122.
- [6] ZHU X L,CHEN L L,SHEN P, et al. High sensitive detection of Cry1Ab protein using a quantum dot-based fluorescence-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemis-

- try, 2011, 59(6): 2184-2189.
- [7] ALBRIGHT V C, HELLMICH R L, COATS J R. Enzyme-linked immunosorbent assay detection and bioactivity of Cry1Ab protein fragments[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2016, 35(12): 3101-3112.
- [8] 邱宇, 曹丽, 郝晓宁, 等. 肺癌 T7 噬菌体文库中 MUC1 蛋白抗原模拟表位的筛选[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(2): 132-136.
- [9] WEI Y, HUA X, LIU X, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for thiacloprid in soil and agro-products with phage-displayed peptide[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 481: 27-32.
- [10] 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.
- [11] 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): 929-941.
- [12] Z ÚÑIGA-NAVARRETE F, GÓMEZ I, PEÑA G, et al. Identification of *Bacillus thuringiensis*, Cry3Aa toxin domain II loop 1 as the binding site of *Tenebrio molitor*, cadherin repeat CR12[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 2015, 59: 50-57.
- [13] 梁靓, 李毅然. 转基因植物及其产品的应用价值和安全风险展望[J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6(11): 4373-4377.
- [14] 丁照鑫, 王涵祎, 曹利娟, 等. 苏云金芽孢杆菌 Vip3Aa10 毒素结合肽的筛选及活性测定[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(18): 3627-3634.
- [15] 胡义, 林山, 李珣, 等. CCR9 亲和短肽的筛选及其结合活性的鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2016, 32(1): 69-72.
- [16] 邓省亮, 李平, 贺伟华, 等. 小分子免疫分析技术及其研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(11): 277-282.
- [17] 于志晶, 蔡勤安, 林秀峰, 等. 转基因抗虫水稻中 BT 蛋白表达量的研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(6): 3251-3252.

(责任编辑: 陈海霞)