

武爱华, 王 耘, 刘 媛, 等. 磁珠筛选抗 Cry2Aa 人源化单链抗体及检测方法的建立[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 945-950.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.034

# 磁珠筛选抗 Cry2Aa 人源化单链抗体及检测方法的建立

武爱华<sup>1</sup>, 王 耘<sup>2</sup>, 刘 媛<sup>1</sup>, 胡晓丹<sup>1</sup>, 刘贤金<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所/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; 2. 金陵科技学院园艺学院, 江苏 南京 210038)

**摘要:** 为了建立转基因成分的快速检测方法, 利用亲和磁珠偶联 Cry2Aa 毒素蛋白从人源化噬菌体抗体库 Tomlinson I 中液相淘选特异性单链抗体 (scFv)。通过 4 轮“扩增-吸附-洗脱”, 从洗脱产物计数板上随机挑取单克隆进行初步鉴定。选取相对结合活性最好的阳性克隆建立间接竞争 ELISA, 确定其检测范围。筛选后第 4 轮相对产出率较第 1 轮提高了  $4.07 \times 10^6$  倍; 单克隆 ELISA 鉴定出 8 个含有完整外源基因片段的阳性克隆, 测序后获得 3 个不同序列的阳性克隆。D5 克隆的噬菌体上清对 Cry2Aa 的检测灵敏度 ( $IC_{10}$ ) 为 6.632 ng/ml, 线性范围为 0.016~2.881  $\mu\text{g/ml}$ 。该克隆对 Cry2Aa 具有良好的特异性和板内板间重现性。

**关键词:** Cry2Aa 毒素; 单链抗体; 磁珠; 间接竞争 ELISA

**中图分类号:** X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)04-0945-06

## Screening and detection of Cry2Aa-binding specific single chain antibody fragments (scFv) from a humanized phage display library by magnetic beads

WU Ai-hua<sup>1</sup>, WANG Yun<sup>2</sup>, LIU Yuan<sup>1</sup>, HU Xiao-dan<sup>1</sup>, LIU Xian-jin<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Quality Safety and Detection Research, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Food Quality and 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; 2. College of Horticulture, Jinling Institute of Technology, Nanjing 210038, China)

**Abstract:** To develop a rapid detection method of transgenic component in agricultural products, specific single chain antibody fragments (scFv) against Cry2Aa toxin were isolated from humanized phage antibody library (Tomlinson I), by optimizing the magnetic beads and liquid spanning strategy. After 4 rounds of “amplification-adsorption-elution”, single colonies were randomly selected from counting plate of the last round for identification. After DNA sequencing, the positive clones with better binding activity were selected to develop an indirect competitive ELISA, and the detection range of the ELISA was determined. The relative yield of the fourth round of screening was  $4.07 \times 10^6$  times higher than that of the first

round. Totally 8 positive clones were identified by indirect competitive ELISA, which recognized Cry2Aa specifically and contained the complete gene fragment. The positive clone D5 showed minimum detection limit of 6.632 ng/ml and linear range of detection of approximately 0.016-2.881  $\mu\text{g/ml}$  ability than others was employed to develop an indirect for Cry2Aa detection by the ELISA method. This method developed in this study has good spe-

收稿日期: 2016-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (3111343, 31201535); 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基金项目 (14KJB210004); 金陵科技学院博士启动项目 (jit-6-201518)

作者简介: 武爱华 (1988-), 女, 山西忻州人, 硕士, 主要从事转基因检测。(E-mail) zhizhuodelei@163.com

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

cificity for Cry2Aa and reproducibility between the plates.

**Key words:** Cry2Aa toxin; specific single chain antibody fragments(scFv); magnetic bead; indirect-competitive ELISA

据国际农业生物技术服务组织 (ISAAA) 统计, 1996—2015 年 20 年间全球转基因作物 (GMO) 种植面积增长了 100 多倍<sup>[1]</sup>。虽然转基因作物以其先进的生物技术优势而实现了大规模商品化种植, 但其环境生态风险及在食物链上传递的生物风险尚未得到充分评估<sup>[2]</sup>。因此建立适当的检测方法对于转基因产品安全监管、标识审查和风险评估具有重要的促进意义。

目前, 转基因产品的检测技术主要有基于核酸检测的多种新型 PCR 技术, 例如实时荧光定量 PCR、环介导等温扩增 PCR 等<sup>[3-7]</sup>, 基于蛋白质检测的 ELISA、免疫生物传感器等技术<sup>[8-12]</sup>。其中免疫检测以其准确、经济、便捷等优势已成为快速检测类应用最为广泛的方法<sup>[13]</sup>, 而免疫检测的灵敏度和准确性主要取决于抗体的制备及检测方法的设计<sup>[14]</sup>。现阶段基因工程抗体以其无需免疫、制备周期短等优点被广泛关注<sup>[15]</sup>。基因工程抗体的独特优势在于可以将基因型与表型联系起来, 使得对亲和力的改造更加便捷<sup>[16]</sup>。本试验利用噬菌体展示技术, 从人源化噬菌体单链抗体库中筛选针对 Cry2Aa 毒蛋白质的单链抗体, 为建立转基因成分的快速检测方法奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

人源化噬菌体单链抗体库 Tomlinson I (库容  $1.47 \times 10^8$ )、辅助噬菌体 KM13、*Escherichia coli* TG1 和 *E. coli* HB2151 购于英国剑桥大学分子生物学实验室和蛋白质基因工程中心, 并由江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所专业技术人员进行扩增。Cry2Aa 蛋白标准品购于上海佑隆公司。亲和素由芬兰 Wallac 公司提供, 亲和素标记的磁珠 Dynabeads Myone streptavidin T1 购于 Invitrogen 公司。HRP-抗 M13 单克隆抗体购于 Pharmacia 公司。BSA (牛血清白蛋白)、脱脂奶粉、卡那霉素、氨基青霉素、胰蛋白酶、TMB (四甲基联苯胺)、PEG<sub>6000</sub> (聚乙二醇 6000) 等均购于 SIGMA 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 生物素标记 Cry2Aa 溶解 0.2 mg Cry2Aa

蛋白于 0.2 ml 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 加 1 mg 生物素于 50.0  $\mu$ l 超纯水中, 取 0.7  $\mu$ l 生物素溶液加入到蛋白质溶液中, 室温放置 30 min。用 PBS 预洗纯化柱, 上样, 加入 1.0 ml PBS 缓冲液, 收集洗脱产物。用分光光度计 (型号 Alpha-1506) 测定生物素化的 Cry2Aa 在 280 nm 处的吸收值, 从而测定蛋白质含量。利用 HABA-亲和素法检测生物素标记效果。生物素化的蛋白质于 4  $^{\circ}$ C 条件下存放。

1.2.2 第 1 轮筛选 参照刘媛等<sup>[17]</sup>的方法略作修改, 亲和素标记的磁珠用 Tris-HCl-Tween 缓冲液 (TBST) 洗涤后, 用 BSA 封闭备用。具体步骤: (1) 包被磁珠, 用 1 nmol 游离生物素和 1 nmol 生物素化的 Cry2Aa 分别与 500.0  $\mu$ l 封闭后的磁珠室温下孵育 1 h。用磁性架吸附磁珠, 去除上清, 再用 TBST 洗涤后重悬于含 1% BSA 的 TBS 中。(2) 负筛选, 在生物素包被的磁珠中加入 1.0 ml 扩增好的噬菌体抗体库 Tomlinson I, 室温孵育 1 h, 用磁性架吸附磁珠。(3) 抗原筛选, 将上述得到的上清移入生物素化的 Cry2Aa 磁珠中, 室温孵育 1 h, 用磁性架吸附磁珠, 弃上清, TBST 洗涤 10 次, 去上清。(4) 洗脱, 加入 250.0  $\mu$ l 10  $\mu$ g/ml 胰蛋白酶, 混匀 30 min。(5) 取 120  $\mu$ l 洗脱的噬菌体加入到 1.5 ml TG1 中 ( $OD_{600} = 0.4$ ), 37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 3 300 g 离心 10 min 后加 200.0  $\mu$ l TES 缓冲液, 均匀涂布在 TYE-A-G 平板上, 剩下的 120.0  $\mu$ l 加甘油保存, 取 10.0  $\mu$ l 系列梯度稀释测定洗脱物滴度, 计算产出投入比。(6) 次级库制备, 次日洗下菌苔接种于新鲜培养基中培养至  $OD_{600}$  为 0.4, 加入辅助噬菌体 KM13, 侵染 30 min, 沉淀物重悬, 37  $^{\circ}$ C 培养 1 h 后添加卡那霉素至终浓度为 50  $\mu$ g/ml, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 次日 10 800 g 离心 15 min, 上清倒至已预冷的 PEG/NaCl 中沉淀噬菌体, 制备出次级库。

1.2.3 第 2~4 轮筛选 第 2~4 轮筛选与第 1 轮相似, 依然选用负筛选策略, 但具体步骤略作调整。生物素化的 Cry2Aa 包被磁珠量逐级降低, 第 1 轮至第 4 轮分别为 1 nmol、100 pmol、10 pmol、1 pmol; 洗涤次数第 1 轮至第 4 轮依次为 10 次、10 次、20 次、20 次。

**1.2.4 单克隆 ELISA 鉴定 单链抗体上清培养:**从第 4 轮滴度计数平板上挑取单个克隆至每孔装有 100.0  $\mu\text{l}$  2 $\times$ TY-A-G 的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养过夜,次日取 2.0  $\mu\text{l}$  加至 200.0  $\mu\text{l}$  新鲜 2 $\times$ TY-A-G 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 h,加入 25.0  $\mu\text{l}$  2 $\times$ TY 培养液(补加含终浓度 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  氨苄青霉素、1% 葡萄糖以及  $1\times 10^9$  KM13 辅助噬菌体)37  $^{\circ}\text{C}$  培养 1 h,静置 1 h,1 800  $g$  离心 10 min,去除上清,沉淀用 220.0  $\mu\text{l}$  2 $\times$ TY-A-K 悬浮,30  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,次日 1 800  $g$  离心 10 min 备用。ELISA 鉴定:(1) 包被,每孔包被 100.0  $\mu\text{l}$  4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cry2Aa 蛋白纯品;(2) 封闭,洗板后每孔加入 200.0  $\mu\text{l}$  2% MPBS,室温封闭 2 h;(3) 加样,洗板 3 次,分别取 100.0  $\mu\text{l}$  离心得到的培养上清液加入到孔中,阴性对照加入 2 $\times$ TY-A-K,室温孵育 1 h;(4) 加二抗,PBST 洗板 3 次,添加 HRP-抗 M13 抗体,室温孵育 1 h;(5) 底物显色,PBST 洗板 3 次,每孔加 100.0  $\mu\text{l}$  四甲基联苯胺(TMB)显色液,室温下反应 15 min,加 50.0  $\mu\text{l}$  2 mol/L 硫酸终止反应,测定  $OD_{450}$  值。

**1.2.5 PCR 验证及测序 单克隆 ELISA 阳性/阴性比值大于 2.1 的克隆为阳性克隆。**将阳性克隆分别接种到 1.0 ml 2 $\times$ TY-A-G 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养到对数期,取 1.0  $\mu\text{l}$  菌液用 PCR 验证其是否携带 935 bp 的外源片段。PCR 引物 LMB3: 5'-CAGGAAACAGC-TATGAC-3'; pHENseq: 5'-CTATGCGGCCCATTC A-3'。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,58  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行验证。将 PCR 鉴定为有完整插入的单克隆进行基因测序,并对测序结果进行比对分析。

**1.2.6 间接竞争 ELISA 方法建立** 取 50.0  $\mu\text{l}$  结合活性最好的噬菌体上清液(含  $1\times 10^{10}$  个噬菌体)与不同浓度的 Cry2Aa 毒素蛋白(用 CBS 缓冲液配制成 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cry2Aa 毒素,再对 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cry2Aa 毒素进行倍半稀释至 1.953  $\text{ng}/\text{ml}$ )混匀后于 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日将混合液加入包被有 Cry2Aa (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的 96 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,PBST 洗板,加入二抗(HRP-抗 M13)孵育 1 h 后,显色,测  $OD_{450}$  值。以噬菌体上清液(不含 Bt 蛋白)反应孔测定值为阳性值,其他为反应值,计算抑制率,抑制率( $I$ )=(阳性值-反应值)/阳性值 $\times 100\%$ 。同时计算其他 Cry 蛋白的交叉反应率( $P/N$ ), $N$  为 Cry 蛋白孔的

吸光度值, $P$  为交叉反应物孔的吸光度值,当  $P/N > 2$  说明抗体与此蛋白有交叉反应。

## 2 结果

### 2.1 KM13 辅助噬菌体和 Tomlinson I 抗体库的扩增结果

根据噬菌体滴度计算公式(滴度=噬菌斑个数 $\times$ 稀释倍数 $\times 100$ )计算滴度。结果显示,KM13 滴度为  $2.0\times 10^{13}$  PFU,抗体库扩增后获得的库滴度为  $3.2\times 10^{12}$  PFU。

### 2.2 特异性噬菌体抗体的富集

以磁珠筛选结合抗原竞争洗脱策略,对噬菌体抗体库进行了 4 轮液相化筛选,结果显示,相对产出率随着筛选轮数的增高而提高,第 4 轮较第 1 轮提高了  $4.07\times 10^6$  倍(表 1)。

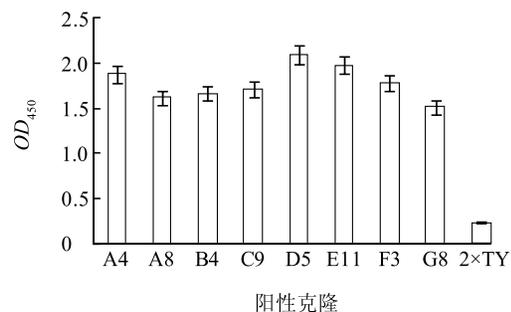
表 1 Cry2Aa 磁珠筛选对噬菌体抗体的富集效应

Table 1 Selective enrichment of phage antibody against Cry2Aa

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
1	$3.2\times 10^{12}$	$5.6\times 10^3$	$1.75\times 10^{-9}$
2	$4.3\times 10^{11}$	$2.4\times 10^5$	$5.58\times 10^{-7}$
3	$5.9\times 10^{11}$	$6.3\times 10^7$	$1.07\times 10^{-4}$
4	$6.6\times 10^{11}$	$4.7\times 10^9$	$7.12\times 10^{-3}$

### 2.3 单克隆 ELISA 鉴定抗 Cry2Aa 阳性克隆

在第 4 轮的洗脱产物中,随机挑选 100 个单菌落,以阳性/阴性比值大于 2.1 为阳性标准,经单克隆 ELISA 检测获得 47 个阳性克隆。再从其中挑选阳性值大于 1.5 的 8 个克隆 A4、A8、B4、C9、D5、E11、F3、G8(图 1)进行后续研究。



2 $\times$ TY 为培养基对照。

图 1 单克隆 ELISA 鉴定抗 Cry2Aa 噬菌体抗体

Fig.1 Phage antibodies against Cry2Aa detected by monoclonal phage ELISA

2.4 噬菌体阳性克隆的 PCR 鉴定

对上述 8 个阳性克隆进行菌液 PCR 检测,在 935 bp 处均有明显的目的条带(图 2)。

2.5 噬菌体阳性克隆序列测定

对上述经 PCR 验证的阳性克隆进行测序并与载体序列比对,最终得到 3 株携带不同氨基酸序列的阳性克隆(图 3)。

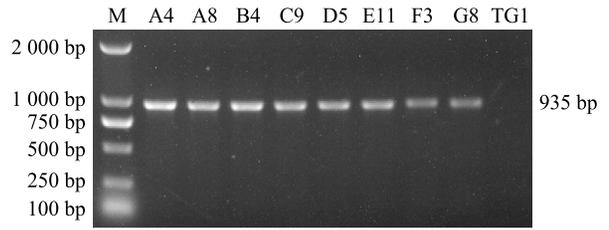


图 2 噬菌体阳性克隆外源基因的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of foreign genes in positive phage clones

		VH-CDR1		VH-CDR2	
D5	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	EVQLLESGGGLVLPGGSLRLS	CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK	GLEWVSITTSYGSATNYADSV	
E11	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK	GLEWVSNITDAGGCTYYADSV	
F3	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK	GLEWVSTISTYGGATSYADSV	
		VH-CDR3	Link		
D5	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKSGNYFDY	WGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGS	TDIQMTQSPSSLSASVGDR
E11	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKSACTFDY	WGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGS	TDIQMTQSPSSLSASVGDR
F3	KGRFTISRDN	SKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAKTNDSFDY	WGQGLTVVSSGGGGSGGGSGGGGS	TDIQMTQSPSSLSASVGDR
		VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3	
D5	VTITCRASQSISSYLNWYQKPGK	KAPKLLIYSASALQSGVPSR	FRFSGSGSDFTLTIS	SLQPEDFATYYCQQCYSNPYTFGQGTKVEIK	
E11	VTITCRASQSISSYLNWYQKPGK	KAPKLLIYTASGLQSGVPSR	FRFSGSGSDFTLTIS	SLQPEDFATYYCQQCYSTPAIFGQGTKVEIK	
F3	VTITCRASQSISSYLNWYQKPGK	KAPKLLIYSASNLSQSGVPSR	FRFSGSGSDFTLTIS	SLQPEDFATYYCQQSSYPDPFGQGTKVEIK	
D5	RAAAHHHHHHH				
E11	RAAAHHHHHHH				
F3	RAAAHHHHHHH				

VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3 为单链抗体重链可变区,VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3 为单链抗体轻链可变区,Link 为单链抗体重、轻链之间的连接肽。

图 3 3 株噬菌体阳性克隆的氨基酸序列

Fig.3 Amino acid sequence of 3 positive phage clones

2.6 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

相同滴度下,选择检测信号最佳( $OD_{450}$ 最大)的阳性克隆 D5,用间接竞争免疫分析法建立了 Cry2Aa 的标准抑制曲线(图 4)。在 0.016~2.881  $\mu\text{g/ml}$  线性检测范围内( $IC_{20}$ - $IC_{80}$ ),线性回归方程为  $Y = 11.525\ln x + 67.804$ ,  $R^2 = 0.9474$ ,最低检测限为 6.632  $\text{ng/ml}$  ( $IC_{10}$ )。该方法对 Cry1Ab、Cry1C、Cry1B、Cry3B 等毒素蛋白测定的 P/N 值均小于 2,因此判断该单链抗体特异性较好。选择 6 个不同浓度的 Cry2Aa 毒素蛋白溶液进行板内和板间分析,根据每一个浓度对应的吸光值计算平均数和标准偏差,得到板内变异系数为 2.5%~7.7%,板间变

异系数为 2.6%~12.3%,板内、板间重复性良好。

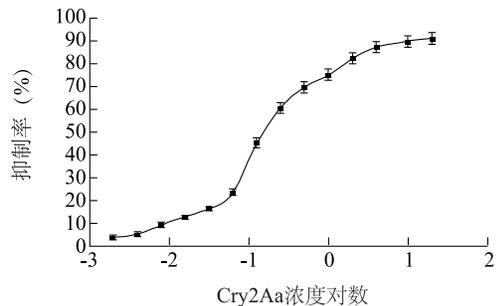


图 4 噬菌体阳性克隆 D5 的抑制曲线

Fig.4 Inhibition curve for positive phage clone D5

### 3 讨论

本研究采用人源化噬菌体展示文库对 Cry2Aa 毒素进行了 4 轮液相磁珠筛选,成功获得了对 Cry2Aa 毒素亲和力较高的噬菌体单链抗体克隆。筛选采用液相磁珠结合负筛选方式,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提供了一种新的策略。在筛选方案的设计方面,我们做了 2 点优化:①筛选过程中先经过生物素的淘选,减少与生物素结合的噬菌体克隆;②逐级递减生物素化 Cry2Aa 包被磁珠的浓度,并在第 2~4 轮增加洗涤次数,严苛筛选条件,减少非特异性和亲和力低的克隆。在单克隆 ELISA 试验中,对第 4 轮产出的克隆随机挑选了 100 个进行鉴定,结果显示阳性克隆达到了 47%,说明本试验采用的筛选方法可以有效地获得与 Cry2Aa 毒素特异性结合的高亲和力噬菌体克隆。

由于 Cry2A 对鳞翅目害虫具有良好的毒性作用,因此被用来减缓或降低因害虫对 Cry1A 毒素产生抗性而造成的影响。Cry2A 毒素的推广应用,也引起了研究者对其检测方法的研究。杜方等利用石英晶体微天平传感技术和特异性单克隆抗体检测 Cry2A 蛋白,灵敏度为  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>[18]</sup>。而蔡淼等利用表面等离子共振传感技术,根据生物分子间的相互作用,在金片表面修饰 Cry2A 蛋白的特异性单克隆抗体,对 Cry2A 蛋白的检测灵敏度可达  $10 \text{ ng}/\text{ml}$ <sup>[19]</sup>。由于单链抗体具有大规模、均一化生产等优点,可以作为替代传统抗体研发快速检测试剂盒的材料。本试验筛选得到的 Cry2Aa 单链抗体的最低检测限为  $6.632 \text{ ng}/\text{ml}$ ,对 Cry2Aa 具有良好的特异性和板内板间重现性,可以满足一般性的含量测定。

本研究结果显示筛选获得的单链抗体的重轻链 CDR1 区没有变化,表明重轻链 CDR2 区和 CDR3 区的改变可能对结合效率有较大影响。因此,后续工作中将采用点突变策略进行亲和力成熟改造,进一步改善抗体的性能,建立更加灵敏

的检测方法。本试验中筛选获得的 Cry2Aa 蛋白特异结合的单链抗体,亦可为研究毒素与受体的相互作用和探究抗性机制提供理论支持。

#### 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] DEVOS Y, AGUILERA J, DIVEKI Z, et al. EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead[J]. Transgenic Research, 2014, 23(1): 1-25.
- [3] KAMLE S, ALI S. Genetically modified crops: detection strategies and biosafety issues[J]. Gene, 2013, 522(2): 123-132.
- [4] NAVARRO E, SERRANO-HERAS G, CASTAÑO M J, et al. Real-time PCR detection chemistry[J]. Clinica Chimica Acta, 2015, 439: 231-250.
- [5] LU J, JI G Z, LI G, et al. Development of a multiplex event-specific PCR assay for detection of genetically modified rice[J]. Cereal Research Communications, 2016, 44(1): 47-56.
- [6] SONG L. Application of digital PCR in analyzing transgenic soybeans[C]//Plant and Animal Genome XXIII Conference Plant and Animal Genome America: San Diego, 2015.
- [7] SHEN P, GENG F, YU Y, et al. A rapid loop-mediated isothermal amplification method for detection of the modified GM cry1A gene in transgenic insect-resistant cotton and rice[J]. Food Control, 2016, 62: 357-364.
- [8] ZHANG X, XU C, ZHANG C, et al. Established a new double antibodies sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab toxin based single-chain variable fragments from a naive mouse phage displayed library[J]. Toxicon, 2014, 81: 13-22.
- [9] SANTOS V O, PELEGRINI P B, MULINARI F, et al. A novel immunochromatographic strip test for rapid detection of Cry1Ac and Cry8Ka5 proteins in genetically modified crops [J]. Analytical Methods, 2015, 7(21): 9331-9339.
- [10] KUSANO T, OKAMOTO K, MATSUMURA T, et al. Genetically modified mouse expressing a xanthine oxidase mutant that produces a higher ratio of superoxide[J]. Flavins and Flavoproteins, 2011, 2013: 245.
- [11] 李冬阳,樊凯,吴坚,等.基于自动磁珠转运的转基因蛋白 Cry1Ab 检测[J].分析化学,2011(9): 5.
- [12] LI J, XU Q, WEI X, et al. Electrogenerated chemiluminescence immunosensor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac based on Fe3O4@

- Au nanoparticles[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(7): 1435-1440.
- [13] KAMLE S, OJHA A, KUMAR A. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Bt protein in transgenic cotton[M]// Zhang B H. *Transgenic Cotton*. New York: Humana Press, 2013: 118-125.
- [14] CRUZ S, CUBILLOS-ZAPATA C, LÓPEZ-CALLEJA I M, et al. Isolation of recombinant antibody fragments (scFv) by phage display technology for detection of almond allergens in food products [J]. *Food Control*, 2015, 54: 322-330.
- [15] HAMMERS C M, STANLEY J R. Antibody phage display: technique and applications [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134(2): 17.
- [16] SIDHU S S. *Phage display in biotechnology and drug discovery* [M]. Taylor & Francis: CRC Press, 2005.
- [17] 刘 媛, HUOVINEN T, 刘贤金, 等. 基于磁珠和时间分辨荧光免疫分析的微囊藻毒素 LR 单链抗体筛选与鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2011, 45(2): 330-337.
- [18] 杜 方, 黄 新, 纪淑娟. Cry2A 蛋白的石英晶体微天平检测 [J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 209-212.
- [19] 蔡 森, 黄 新, 岳喜庆. 表面等离子共振传感检测 Cry2A [J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 201-204.

(责任编辑:张震林)