

双抗夹心 ELISA 方法检测转 *cry8Ca* 基因烟草的杀虫蛋白

王容燕^{1,2}, 董建臻¹, 王金耀², 郎志宏³, 曹伟平², 宋福平³, 杜立新², 宋健², 冯书亮²

(¹河北农业大学, 河北保定 071051; ²河北省农林科学院植物保护研究所, 河北保定 071000;

³中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要: 为了检测抗金龟子幼虫的转 *cry8Ca* 基因烟草杀虫蛋白的含量, 对双抗夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA) 检测体系中的反应条件进行了优化。采用方阵法对血清抗体的反应浓度进行筛选, 对提取液、包被液、封闭液和底物作用时间进行比较和优选, 结果确定多克隆抗体浓度为 1 : 3200, 酶标结合物浓度为 1 : 400, pH 9.6 碳酸缓冲液提取, pH7.4 磷酸缓冲液包被, 0.5% 明胶-PBST 封闭, TMB 底物作用 15 min 为最佳双抗夹心 ELISA 检测条件。通过这一检测体系, 对转 *cry8Ca* 基因烟草植株进行检测, S12 株系的 Cry8C 蛋白含量最高, 每克鲜重含有 12.683~14.461 μg , 占总蛋白量的 0.052%~0.062%。

关键词: 双抗夹心 ELISA; Cry8Ca 蛋白; 转基因烟草; 金龟子幼虫

中图分类号: S 433.1 文献标识码: A

Detection of Insecticidal Protein in Transgenic *cry8Ca* Tobacco by Double-antibody Sandwich (DAS) ELISA

Wang Rongyan^{1,2}, Dong Jianzhen¹, Wang Jinyao², Lang Zhihong³, Cao Weiping², Song Fuping³,
Du Lixin², Song Jian², Feng Shuliang²

(¹College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071051;

²Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Baoding Hebei 071000;

³State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

Abstract: Enzyme linked immunosorbent assay is widely used to detect insecticidal protein in transgenic plant. The reaction conditions for Double-antibody Sandwich (DAS) ELISA were optimized to detect insecticidal protein in transgenic *cry8Ca* tobacco against Rutelidae larvae (Coleoptera:Scarabaeidae). The results showed that the density of anti-rabbit immun serum and the enzyme(HRP)-labelled antibody were 1 : 3200 and 1 : 400 respectively, extracting buffer was NaHCO_3 - Na_2CO_3 (pH 9.6), coating buffer was PBS (pH7.4), confining liquid was 0.5% Gelatin-PBST and TMB substrate action time was 15min. Cry8Ca proteins in transgenic tobaccos were detected by this DAS - ELISA. Cry8Ca protein in the roots of line S12 was expressed 12.683~14.461 μg per gram fresh weigh. It was about 0.052%~0.062% of total protein which was more than other lines.

Key words: double-antibody sandwich ELISA, Cry8Ca protein, transgenic tobacco, scarabaeidae

基金项目: 国家转基因植物研究专项“新型抗虫 Bt 基因和芋螺毒素基因的克隆”(JY03A22); 河北省农林科学院青年基金项目“转基因烟草抗蛴螬鉴定体系的建立”(A06050101)。

第一作者简介: 王容燕, 女, 1971 年出生, 湖南长沙人, 副研究员, 在职硕士生, 主要从事害虫生物防治的研究。通信地址: 071000 河北农林科学院植物保护研究所, 保定市东关大街 437 号, Tel: 0312-5915680, E-mail: rongyanw@163.com。

通讯作者: 冯书亮, 男, 1957 年出生, 河北威县人, 研究员, 大学本科, 主要从事害虫生物防治的研究。通信地址: 071000 河北农林科学院植物保护研究所, 保定市东关大街 437 号, Tel: 0312-5915680, E-mail: fshliang@163.com。

收稿日期: 2008-12-01, 修回日期: 2009-01-16。

0 引言

随着植物基因工程研究的发展,转Bt基因植物在农业生产上得到了广泛的开发和应用。*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry2Ab*、*cry3Bb*等基因在棉花、玉米等作物上应用^[1],对鳞翅目害虫和鞘翅目叶甲类害虫表现了很好的抗虫性。*cry8Ca*基因是对鞘翅目丽金龟科幼虫高毒力的杀虫蛋白基因,郎志宏^[2]以CaMV35s为启动子,构建了植物表达载体pSMCN,通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导,将人工改造优化的*mcry8Ca*基因转化到烟草中,获得了转*cry8Ca*基因的抗金龟子幼虫的烟草植株。

目前对于转基因植物的检测,分为DNA水平、RNA水平、蛋白质水平检测及抗虫生物测定等。其中,酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种快速、准确、灵敏、操作简便的免疫酶检测技术,广泛应用于转基因植物表达的定量检测。王保民等采用单克隆抗体对转Bt(*cry1A*)抗虫棉的不同器官的毒蛋白含量进行了检测^[3],并研制出了检测试剂盒^[4]。但是,由于Cry1A类蛋白与Cry8C类蛋白的同源性差,该检测体系不适合检测Cry8Ca杀虫蛋白,因此,此项研究在制备多克隆抗体的基础上,对双抗夹心ELISA检测体系中的各种反应条件进行了优化,并对供试的转*cry8Ca*基因烟草植株进行了检测。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

该试验于2008年4—11月在河北省农科院植保所杀虫微生物实验室完成。

1.2 试验材料

1.2.1 供试转*cry8Ca*基因烟草 由中国农科院植保所国家重点实验室提供,分为阳性植株和对照植株。

1.2.2 多克隆抗体及酶(HRP)标记结合物 将纯化的Cry8Ca蛋白免疫注射家兔,获得抗血清,效价为1:25600,-70℃保存备用。

采用辛酸-硫酸铵盐析法纯化多克隆抗体^[5],获得免疫球蛋白(IgG),采用过碘酸钠法,用辣根过氧化物酶(HRP)标记IgG,作为酶标记结合物,-70℃保存备用。

1.3 试验方法

1.3.1 双抗夹心(DAS)ELISA的检测程序 将烟草植株的根部样品0.5g液氮研磨,分别加入5ml的CBS提取液,浸提4h。4℃,10000rpm离心10min,取上清液备用。

(1)包被:用PBS稀释6000倍的一抗加于酶标孔内,150μl/孔,4℃包被过夜,洗板3次。(2)封闭:每孔

加200μl封闭液(2%脱脂牛奶的PBS-T),37℃封闭1.5h,洗板3次。(3)加抗原和样品:设3条抗原标准曲线;样品提取液采用PBS稀释到一定浓度,100μl/孔,同时做3个重复,37℃反应2h,洗板4次。(4)加PBST稀释400倍的HRP酶标抗体结合物,150μl/孔,37℃反应1h,洗板4次。(5)加底物:加TMB底物溶液150μl/孔,37℃反应15min。底物溶液:Na₂HPO₄ 1.46g,柠檬酸0.94g,pH调4.75,定容100ml;TMB称取0.0010g,用少量二甲基亚砜(DMSO)溶解,加入10ml底物溶液中,用前加入15μl的30%H₂O₂。(6)反应15min,用2M的硫酸终止反应,50μl/孔,在酶标仪上450nm波长读数。

1.3.2 封闭液的优选 采用0.5%明胶、1%明胶、2%脱脂牛奶、1%BSA和3%BSA,PBST稀释后作为封闭液,比较不同封闭液对测定结果的影响。

1.3.3 TMB底物作用时间的优选 加入底物后,室温下分别作用10、15、20min,终止反应,根据OD₄₅₀值选择最佳底物作用时间。

1.3.4 包被液的优选 将植株样品,采用CBS提取后,分别用PBS、CBS和柠檬酸缓冲液稀释作为包被液,比较不同包被液对测定结果的影响。

1.3.5 提取液的优选 采用以下6种提取液,对烟草植株根部的杀虫蛋白进行提取,测定OD₄₅₀,比较提取效果。

(1)Tirs-EDTA:50mM Tris-HCl,pH 8.0,1mM EDTA,5%v/v甘油,1mM DTT and 0.1% Triton X100;
(2)碳酸缓冲液(CBS):2.93g NaHCO₃,1.59g Na₂CO₃,定容至1L,pH 9.6;
(3)磷酸缓冲液(PBS):8.0g NaCl,2.9g Na₂HPO₄·12H₂O,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄,定容至1L,pH 7.4;
(4)柠檬酸缓冲液:1.37g柠檬酸,22.7g柠檬酸铵,定容至1L,pH 6.1;
(5)Tirs-硼酸^[6]:100mmol/L Tris-HCl,10mmol/L 硼酸,10mmol/L MgCl₂,0.2%L-抗坏血酸,pH调至7.5;
(6)Na₂CO₃-VC^[6]:50mmol/L Na₂CO₃,0.2%L-抗坏血酸(VC),pH9.6。

1.3.6 转基因烟草蛋白含量的检测 采用建立的最优双抗夹心ELISA检测体系,对9株转基因烟草阳性植株的根部杀虫蛋白量进行检测,并采用BCA蛋白检测试剂盒检测其总蛋白含量。

1.3.7 统计分析 测定OD₄₅₀结果后,将阳性植株的OD₄₅₀(P)与对照植株的OD₄₅₀(N)比较,计算P/N,选择OD₄₅₀值最高,且P/N值最大的处理,作为最佳方案;采用ELISA数据分析软件进行数据整理,计算植株中的蛋白含量。

表1 抗体包被量及酶标抗体结合物浓度的确定

一抗	酶标抗体结合物			
	1 : 400	1 : 800	1 : 1600	1 : 3200
1 : 800(P)	1.07	0.847	0.599	0.399
(N)	0.255	0.207	0.147	0.119
P/N	4.196	4.092	4.075	3.353
1 : 1600(P)	1.092	0.849	0.587	0.397
(N)	0.249	0.182	0.138	0.117
P/N	4.386	4.665	4.254	3.393
1 : 3200(P)	1.089	0.855	0.644	0.421
(N)	0.232	0.179	0.129	0.102
P/N	4.694	4.777	4.992	4.127
1 : 6400(P)	1.035	0.821	0.584	0.392
(N)	0.234	0.175	0.135	0.1
P/N	4.423	4.691	4.326	3.92

2 结果与分析

2.1 抗体包被量与酶标抗体结合物浓度的优化

采用方阵法对双抗夹心ELISA反应中包被抗体与酶标结合物的浓度进行优化(表1)。选择P值接近1,且P/N值较大的包被抗体浓度与酶标结合物浓度,确定最佳包被抗体反应浓度为1 : 3200,最佳酶标结合物的反应浓度为1 : 400。

2.2 封闭液的优选

对常用的5种封闭液进行优选,结果表明(见表2),0.5%明胶作为封闭液,OD₄₅₀值最大,且P/N值相对较高,为最佳封闭液。2%脱脂牛奶虽然P/N值最高,但OD₄₅₀值最小,不能作为最佳选择。

2.3 TMB底物作用时间的优选

加入TMB底物后进行显色反应,20 min时,OD₄₅₀

值最高(见表3),但P/N值较15 min时低,这说明随着显色时间的增加,阳性对照OD值逐渐增加,但同时阴性对照的OD值也逐渐增加。因此,选择反应15 min为最佳底物作用时间。

2.4 包被液的优选

在选用的3种包被液中(表4),磷酸缓冲液的P/N值最高,OD₄₅₀值略低于碳酸缓冲液,因此,磷酸缓冲液为最佳包被缓冲液。

2.5 提取液的优选

对6种提取液的提取效果进行比较,Tirs-硼酸提取液对总蛋白的提取效果最好,OD₄₅₀值也最高,但P/N值较低,碳酸缓冲液的P/N值最高,OD₄₅₀值与磷酸缓冲液、柠檬酸缓冲液的值差异不大,因此,确定碳酸缓冲液为最佳提取液(表5)。

表2 最佳封闭液的选择

	0.5%明胶	1%明胶	2%脱脂牛奶	1%BSA	3%BSA
OD ₄₅₀	0.608	0.605	0.255	0.474	0.489
P/N	2.857	2.599	3.311	2.450	2.378

表3 最佳TMB底物作用时间优选

	10 min	15 min	20 min
OD ₄₅₀	0.535	0.771	1.176
P/N	2.348	2.382	2.286

表4 最佳包被液的选择

	碳酸缓冲液	磷酸缓冲液	柠檬酸缓冲液
OD ₄₅₀	0.665	0.607	0.423
P/N	1.880	2.866	2.261

表5 最佳提取液的优选

	Tirs-EDTA	碳酸缓冲液	磷酸缓冲液	柠檬酸缓冲液	Tirs-硼酸	Na ₂ CO ₃ -VC
OD ₄₅₀	0.350	1.216	1.211	1.222	1.308	0.959
P/N	2.154	4.438	3.130	3.107	2.242	2.401
Cry8C蛋白量 (ug/g 鲜重)	0.445	4.190	4.156	4.231	4.860	2.714
总蛋白量 (ug/g 鲜重)	16700	18825	14164	15128	251735	107553
占总蛋白量的百分比/%	0.003	0.022	0.029	0.028	0.002	0.003

2.6 转基因烟草Cry8C蛋白的含量

通过以上条件优化,确定抗体浓度为1:3200,酶标结合物浓度为1:400,碳酸缓冲液提取,磷酸缓冲液包被,0.5%明胶封闭,TMB底物作用15 min为最佳双抗夹心ELISA检测条件,采用这一检测体系,对9株

转*cry8Ca*基因烟草植株进行检测,将OD₄₅₀值代入标准曲线中,得出*cry8C*蛋白的含量。结果显示(表6),S12株系中的3株植株的Cry8C蛋白含量为最高,每克鲜重含有12.683~14.461 μg,占总蛋白量的0.052%~0.062%。

表6 双抗夹心ELISA方法检测9株转*cry8Ca*基因烟草的杀虫晶体蛋白的含量

株系	S12-2	S12-5	S12-6	S19-5	S19-6	S19-8	S103	S107	S3	负CK
OD ₄₅₀	0.772	0.741	0.756	0.626	0.662	0.601	0.582	0.42	0.607	0.126
Cry8C蛋白量/(μg/g)	14.461	12.683	13.481	7.929	8.722	8.144	7.743	5.173	8.254	—
总蛋白量/(μg/g)	25300	24279	21825	24634	27585	22229	18492	27014	18445	—
占总蛋白量的百分比/%	0.057	0.052	0.062	0.032	0.032	0.037	0.042	0.019	0.045	—

3 讨论

金龟子类幼虫是鞘翅目金龟总科(Scarabaeoidea)的幼虫(俗称蛴螬),是一类重要的地下害虫,每年对农业、园艺、园林生产造成的损失极为严重^[7]。因此,将对金龟子幼虫高毒力的*cry8Ca*基因转化到植物中,获得抗性植株,将会成为生物防治金龟子幼虫的有效手段。但是,由于蛴螬的大规模室内饲养较难,制约了对转基因植物的抗虫评价,因此,通过表达蛋白的检测,建立ELISA检测方法,可以提高转*cry8Ca*基因植物的检测效率。

酶联免疫吸附法(ELISA)是一种快速、灵敏的检测方法,反应条件的每一个环节,都是影响检测结果的重要因素。转基因植物ELISA检测中,普遍存在阴性对照OD值高的问题^[8],在此项研究中,采用了优选的适宜提取液,在抗原包被及酶标结合物反应后增加洗板次数,底物反应时间缩短为15 min等措施,这些措施可使阴性对照的值降低很多,使测定结果更加可信,为今后利用免疫学方法检测转*cry8C*基因植物提供了依据。

参考文献

- [1] Romeis J, Meissle M, Bigler F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(1):63-71.
- [2] 郎志宏. 苏云金芽孢杆菌*cry8Ca*基因的活性分析及在转基因烟草中的表达[D]. 北京:中国农业科学院,2005:39-50.
- [3] 王保民,李召虎,李斌,等. 转Bt抗虫棉各器官毒蛋白的含量及表达. *农业生物技术学报*,2002,10(3):215-219.
- [4] 王保民. Bt毒蛋白免疫检测试剂盒的制备与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2000:21-22.
- [5] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术. 北京:第四军医大学出版社,2002.
- [6] 郭艾英. 应用ELISA检测转基因棉花中Bt蛋白的研究[D]. 天津:天津科技大学,2006:11-14.
- [7] 魏鸿钧,张治良,王荫长. 中国地下害虫. 上海:上海科学技术出版社,1989:1-40.
- [8] 张小四,李松岗,许崇任,等. 转Bt棉不同生育期与不同器官杀虫蛋白表达量的免疫学方法测定. *北京大学学报:自然科学版*,2000,36:477-484.