

表面等离子共振传感检测Cry2A蛋白

蔡 淼¹, 黄 新², 岳喜庆^{1,*}

(1.沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866; 2.中国检验检疫科学研究院植物检疫研究所, 北京 100029)

摘 要:目的: 建立利用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)传感器检测转基因植物中苏云金芽孢杆菌Cry2A蛋白的方法。方法: 利用SPR检测技术, 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, 对不同质量浓度梯度的Cry2A蛋白进行检测研究。结果: 该方法可有效地检测到Cry2A蛋白, 检测灵敏度可达10 ng/mL, 与同为抗虫基因编码的Cry1Ac和Cry2Ab蛋白未出现交叉反应。结论: 利用SPR方法检测Cry2A蛋白操作简单, 省时且灵敏度高、特异性强, 可用于对Cry2A蛋白的定性检测。

关键词: 表面等离子共振传感器; Cry2A蛋白; 苏云金芽孢杆菌; 转基因植物

Using a Surface Plasmon Resonance Sensor for the Detection of *Bacillus thuringiensis* Cry2A Protein

CAI Miao¹, HUANG Xin², YUE Xi-qing^{1,*}

(1. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. Institute of Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: Purpose: To establish a method to detect *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2A protein by surface plasmon resonance (SPR) sensor. Methods: By using SPR based on interaction between biomolecules, the monoclonal antibodies specific to the Cry2A protein were modified on the gold surface for the detection of this protein. Results: The detection limit of Cry2A protein was 10 ng/mL by this method without cross-reaction with Cry1Ac or Cry2Ab protein. Conclusion: The SPR method was simple, time-saving, sensitive, specific and applicable for the qualitative detection of Bt Cry2A protein.

Key words: surface plasmon resonance sensor; Cry2A protein; *Bacillus thuringiensis*; genetically modified plant

中图分类号: Q31

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)24-0201-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424038

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt), 是一种分布非常广泛的革兰氏阳性病原性细菌^[1], 其在芽孢形成时会产生具有杀虫活性的晶体蛋白质^[2], 称为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal protein, ICP)。利用转基因技术将Bt基因导入植物中, 改良植物品种, 使改良后的植物具有抗虫基因, 可有效杀灭多种害虫^[3-7]。在节省害虫防治成本的同时, 还能缓解因大量施用农药而造成的环境污染。目前已有多种转Bt基因农作物实现了商业化种植, 如玉米、棉花、马铃薯、番茄等^[8]。然而, 由于转基因产品的安全性问题一直备受关注, 各国对于转基因产品的种植和进口都有着严格的规定, 因此研究出一种简便快捷地检测转Bt基因作物的方法具有重要的现实意义。本研究针对Bt蛋白中的Cry2A蛋白进行检测研究, Cry2A蛋白能同时杀灭鳞翅目害虫和双翅目害虫。

表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)技术是近些年得到长足发展的一项应用于分析生物分子

间相互作用的检测技术^[9-14], 而表面等离子共振传感器便是基于这种技术的一种光学传感器, 它利用全反射时入射光可以和金属表面的等离子发生共振的原理, 检测生物分子之间的相互作用与结合过程以及动力学反应^[11,15-18]。相比其他检测方法, SPR方法具有以下几个优点: 1) 检测样品不需标记, 避免了样品因为标记不当而失去活性^[19-22]; 2) 可做到动态实时监测; 3) 检测过程非常简便且灵敏度高。目前该技术已广泛应用于食品分析、蛋白质^[23-25]与核酸检测^[26-27]、药物筛选、临床医学等各个领域。本实验便是基于这种技术, 利用SPR传感器对Bt抗虫蛋白Cry2A进行了检测研究。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

单侧镀金玻璃片(12 mm×20 mm, 单侧镀金

收稿日期: 2014-01-17

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201410014)

作者简介: 蔡淼(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为转基因检测。E-mail: 779302469@qq.com

*通信作者: 岳喜庆(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: yxqsyou@126.com

50 nm)、SPR Navi 200传感器 芬兰BioNavis公司; 蒸馏水; 无水乙醇; 30%氨水、30%双氧水均为分析纯; 巯基十一酸(11-mercaptopundecanoic acid, 11-MUA) Sigma中国上海有限公司; 3-巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, 3-MPA)、脂肪酸甲酯磺酸盐(fatty acid methyl ester sulfonate, MES)、*N*-乙基-*N'*-(二甲基氨基丙基)碳二亚胺(*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(1-hydroxy-5-pyrrolidinedione, NHS)、Cry2A蛋白及其单克隆抗体、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液(20 mmol/L NaH_2PO_4 , 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)、DHG-9030恒温干燥箱 北京江阴滨江设备公司; Cry2A蛋白检测试剂盒 美国Envirologix公司。

1.2 方法

1.2.1 SPR金片预处理

将30%氨水、30%双氧水、蒸馏水按照1:1:5的体积比混合, 把金片置入其中, 于水浴锅中煮沸, 温度设置为80~90℃, 10 min后取出, 用蒸馏水及无水乙醇分别清洗金片表面, 氮气吹干表面, 以便用于后续实验。

1.2.2 SPR金片表面修饰

将10 mmol/L 3-MPA溶液与10 mmol/L 11-MUA溶液以10:1的比例混合, 把金片镀金的一面朝上置于其中, 浸泡24 h; 取出金片, 用蒸馏水及无水乙醇冲洗金片并用氮气吹干, 于金片表面滴加100 μL EDC (0.4 mol/L), 100 μL NHS (0.1 mol/L) (EDC、NHS均用MES溶解) 以活化金片表面的硫醇羧基, 室温静置2 h后用蒸馏水及无水乙醇清洗金片, 氮气吹干, 再次滴加100 μL EDC, 100 μL NHS, 室温静置2 h; 蒸馏水及无水乙醇清洗并吹干金片, 金片表面滴加100 μL Cry2A单克隆抗体溶液(0.2 mg/mL, PBS稀释), 37℃恒温箱中静置3 h; 蒸馏水洗去表面抗体溶液, 氮气吹干, 2 mg/mL PBS稀释, 覆盖于金片表面, 室温静置2 h, 用蒸馏水将金片表面清洗干净, 吹干, 置于PBS中4℃保存。

1.2.3 SPR检测样品

取出金片, 用蒸馏水洗净, 氮气吹干, 将金片放入SPR传感器的指定位置中, 打开仪器和监测软件, 通入PBS(使用前需超声), 流速为10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 待反应池及棱镜温度达到设置温度后进行初始角度扫描(一般将反应温度设置为低于室温1~2℃), 找到固定角后进行固定角扫描, 待基线稳定后, 用进样注射器注入300 μL 待测样品溶液(PBS稀释), 通过SPR检测软件实时观察反应过程。

1.2.4 酶联免疫(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测Cry2A蛋白

将Cry2A标准样品稀释到目标质量浓度, 取100 μL

加入到样品板中, 室温静置15 min, 加入100 μL 酶标抗体, 室温孵育1 h, 倾去反应液, 拍干, 吐温-PBS缓冲液(tween PBS, PBST)洗涤3次, 加入100 μL 底物, 静置30 min, 最后加入100 μL 终止液, 使用酶标仪读数。

2 结果与分析

2.1 SPR检测Cry2A蛋白的灵敏度

将待测抗原Cry2A稀释成不同质量浓度(10~1 000 ng/mL), 每种质量浓度在同一条件下重复检测3次, 对结果进行分析, 计算平均值, 结果如图1所示。进样后约30 s开始产生响应, 表明待测样品流经金片表面时与结合在金片表面的单抗发生特异性结合, 引起金片表面折射率的变化, 使SPR角度发生偏移。样品质量浓度越高, 响应值越大, 说明结合在金片表面的抗原越多。从实验结果可以看出, 使用SPR检测Cry2A蛋白的最低检测限为10 ng/mL。

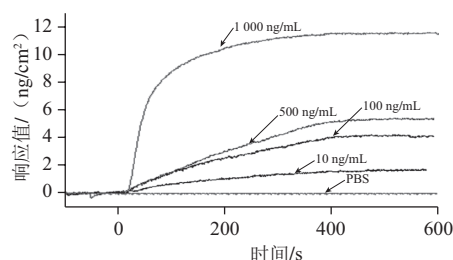


图1 SPR检测Cry2A蛋白的灵敏度

Fig.1 Sensitivity of SPR for the detection of Cry2A protein

2.2 SPR检测Cry2A蛋白的重复性

选取4种不同质量浓度的Cry2A蛋白重复检测3次, 表1结果显示每次检测都有明显的反应, 且同一质量浓度的响应值差异很小, 随蛋白质量浓度的降低反应响应值也相应减小, 表明SPR检测Cry2A的重复性较好。

表1 SPR检测Cry2A蛋白的重复性

Table 1 Repeatability of SPR for the detection of Cry2A protein

Cry2A质量浓度 / (ng/mL)	响应值测定值 / (ng/cm²)			响应值平均值 / (ng/cm²)	标准偏差 / (ng/cm²)	变异系数/%
	1	2	3			
10	1.55	1.87	1.63	1.68	0.136	8.1
100	4.03	4.22	4.54	4.26	0.210	4.9
500	5.64	5.53	5.06	5.41	0.252	4.7
1 000	11.64	11.75	11.35	11.58	0.171	1.5

2.3 SPR检测Cry2A蛋白的特异性

为了验证SPR检测Cry2A蛋白的特异性, 选用另外两种抗虫Bt蛋白Cry1Ac和Cry2Ab作为对照, 3种蛋白均以1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度进样, 进行3次特异性检测实验。结果如图2所示, Cry2A蛋白有明显响应, 而Cry1Ac和Cry2Ab蛋白则未出现明显响应, 由此可见此方法检测Cry2A蛋白具有较好的特异性。

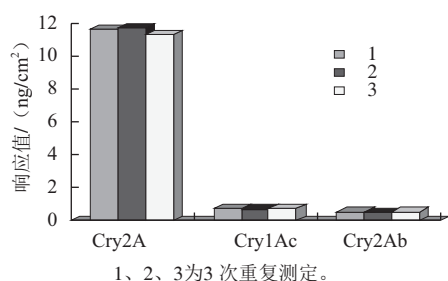


图2 SPR检测Cry2A蛋白的特异性

Fig.2 Specificity of SPR for the detection of Cry2A protein

2.4 ELISA法检测Cry2A蛋白

使用Cry2A检测试剂盒对不同质量浓度的Cry2A抗原进行了检测, 每个质量浓度3个重复, 结果如表2所示。阴性样品的OD值一般不超过0.2, 超过0.2均视为阳性样品, 故ELISA法检测Cry2A蛋白的灵敏度可达10 ng/mL, 与SPR方法灵敏度相当, 但SPR方法具有免标记、操作简便、快捷的优势。

表2 ELISA检测Cry2A蛋白灵敏度
Table 2 Sensitivity of ELISA for the detection of Cry2A protein

标准品质量浓度/(ng/mL)	1 000	500	100	10	0
OD _{450 nm} 值	2.177	1.331	0.511	0.276	0.137
	2.298	1.393	0.551	0.262	0.127
	2.150	1.318	0.546	0.273	0.133
平均值	2.208	1.347	0.536	0.270	0.132

3 讨论与结论

转基因产品的安全问题一直备受关注, 我国政府高度重视转基因植物安全检测工作。因此, 对于转基因产品检测新方法的研究具有重大的现实意义。SPR传感器是近年来迅速发展起来的新型检测仪器。近30 a来, SPR传感器在技术发展和应用领域等方面都有很大的进步, 现已成为一种检测生物分子间相互作用的核心手段, 且SPR检测金片可反复使用30次左右, 降低了实验成本。但SPR技术在灵敏度、多通道检测等方面还有不足。在灵敏度方面目前SPR技术还无法准确检测到一些低浓度、小分子质量的分子。在实现多通道检测方面, 目前SPR传感器仅可同时检测两组数据。以上两方面问题将是今后SPR检测研究的主要方向。本实验基于抗原抗体特异性结合的原理, 运用SPR检测技术, 研究建立了Cry2A蛋白的新的检测方法。该方法检测灵敏度可达10 ng/mL, 与传统的ELISA检测方法灵敏度相似, 但SPR方法具有免标记、实时监测、操作省时简便等优势, 且特异性较好, 在与Cry1Ac和Cry2Ab蛋白的对照检测中可看出, Cry1Ac和Cry2Ab蛋白未出现明显响应, 而Cry2A蛋白响应明显。重复性实验结果表明此方法具有较好的稳定性, 可实现对Cry2A蛋白的定性检测, 为Bt蛋白的检测提供了一种新的可行性方法。

参考文献:

- [1] 李海涛, 姚江, 郭巍, 等. 苏云金芽孢杆菌Cry2Aa基因的克隆、表达与活性[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(6): 787-791.
- [2] LEE M K, PAUL M, CHEN J S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 339(4): 1043-1047.
- [3] 徐雪亮, 韩宇, 吴刚. 转cry1Ab/Ac, cry1C, cry2A基因水稻对田间稻纵卷叶螟及其捕食类天敌的影响[J]. 中国科学: 生命科学, 2011, 41(11): 1095-1104.
- [4] 常雪, 王伟, 沈志成, 等. 转cry1Ab/cry2Aj玉米对亚洲玉米螟的抗性评价[J]. 植物保护学报, 2013, 40(4): 339-344.
- [5] 张岚, 林克剑, 李飞, 等. 转cry1C和cry2A不同抗虫基因水稻品种对非靶标害虫灰飞虱生物学特性的影响[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 120-125.
- [6] SHARON D, ROD M. Evolution ecology and management of resistance in *Helicoverpa* spp. to Bt cotton in Australia[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2012, 110(3): 281-286.
- [7] LU Qiong, CAO Guangchun, ZHANG Lili, et al. The binding character of cry insecticidal proteins to the brush border membrane vesicles of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura* and *Agrotis ipsilon*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(9): 1598-1605.
- [8] MANN R S, GILL R S, DHAWAN A K, et al. Relative abundance and damage by target and non-target insects on Bollgard and BollgardII cotton cultivars[J]. Crop Protection, 2010, 29(8): 793-801.
- [9] KANG C D, LEE S W, PARK T H, et al. Performance enhancement of real-time detection of protozoan parasite, *Cryptosporidium oocyst* by a modified surface plasmon resonance (SPR) biosensor[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(3): 387-390.
- [10] CHEN X, PAN M, JIANG K. Sensitivity enhancement of SPR biosensor by improving surface quality of glass slides[J]. Microelectronic Engineering, 2010, 87(5/6/7/8): 790-792.
- [11] CHUNG J W, KIM S D, BERNHARDT R. Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (HBV) [J]. Sensors and Actuators B, 2005, 111/112(11): 416-422.
- [12] PARK M, JOACHIM J, PYUN J C. SPR biosensor by using *E. coli* outer membrane layer with autodisplayed Z-domains[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 154(2): 82-88.
- [13] WANG Jing, SONG Daqian, WANG Liying, et al. Design and performance of immunoassay based on SPR biosensor with Au/Ag alloy nanocomposites[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 157(2): 547-553.
- [14] ZHANG Hua, SUN Ying, WANG Jing, et al. Preparation and application of novel nanocomposites of magnetic-Au nanorod in SPR biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 34(1): 137-143.
- [15] MARIOTTI E, MINUNNI M, MASCINI M. Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 453(2): 165-172.
- [16] CHABOT V, MIRON Y, CHARETTE P G, et al. Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 50(15): 125-131.
- [17] SUN Ying, BI Ning, SONG Daqian, et al. Preparation of titania sol-gel matrix for the immunoassay by SPR biosensor with magnetic beads[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2008, 134(2): 566-572.
- [18] SHIN Y B, KIM H M, JUNG Y W, et al. A new palm-sized surface

- plasmon resonance (SPR) biosensor based on modulation of a light source by a rotating mirror[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 150(1): 1-6.
- [19] KANG C D, LEE S W, PARK T Y, et al. Performance enhancement of real-time detection of protozoan parasite, *Cryptosporidium oocyst* by a modified surface plasmon resonance (SPR) biosensor[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(3): 387-390.
- [20] MANERA M G, FERREIRO-VILA E, GARCIA-MARTIN J M, et al. Enhanced magneto-optical SPR platform for amine sensing based on Zn porphyrin dimers[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 182: 232-238.
- [21] CHEN X, PAN M, JIANG K. Sensitivity enhancement of SPR biosensor by improving surface quality of glass slides[J]. *Microelectronic Engineering*, 2010, 87(5/6/7/8): 790-792.
- [22] KAROONUTHAISIRI N, CHARLERMROJ R, MORTON M J, et al. Development of a M13 bacteriophage-based SPR detection using *Salmonella* as a case study[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 190: 214-220.
- [23] SOTA H, HASEGAWA Y, IWAKURA M. Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance[J]. *Analytical Chemistry*, 1998, 70(10): 2019-2024.
- [24] MASSARELLI. Computational modeling and surface plasmon resonance analyses in the assessment of peptide ligands interacting with fibrin gamma(312-324)epitope[J]. *European Journal Medicinal Chemistry*, 2009, 44(5): 2128-2134.
- [25] COCHRAN S, LI C P, FERRO V. A surface plasmon resonance-based solution affinity assay for heparan sulfate-binding proteins[J]. *Glycoconjugate Journal*, 2009, 26(5): 577-587.
- [26] MONTEIRO J P, FERREIRA J, SABAT R G, et al. SPR based biosensor using surface relief grating in transmission mode[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 174: 270-273.
- [27] NAKAMURA K, SAKAGAMI H, ASANUMA-DATE K, et al. Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary dilacNAc structures[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 382(15): 77-85.