

技术与方法

转基因植物中 Bt 杀虫蛋白的重组噬菌体辅助检测*

李利红 李常青 黄秀梨¹⁾ 田颖川^{**}

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘要 以 LRP 和棉花总蛋白为本底蛋白, 纯化的 Bt 杀虫蛋白为目标蛋白, 利用噬菌体展示技术从噬菌体的随机七肽库中筛选与 Bt 蛋白特异性结合的七肽. ELISA 检测表明经过三轮淘筛过程, 特异性多肽得到了高度富集, 其中 PH5 可与 Bt 蛋白特异性结合. 将筛选出的 PH5 作为 Bt 蛋白的“类抗体”用于抗虫转基因植物的检测, 由此建立了一种新的检测方法, 讨论了噬菌体展示技术在植物基因工程中的潜在应用价值.

关键词 Bt 杀虫蛋白, 噬菌体表面展示, ELISA 检测

学科分类号 Q78

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 毒蛋白基因已广泛应用于抗虫转基因植物的研究, 但转基因植物中 Bt 蛋白的检测还存在一些问题. 因 Bt 蛋白在转基因植物中的表达量很低, 难以检测, 且其抗血清和单抗制备不易, 不同批抗体制品的滴度及特异性都有较大差异, 所以现在常用的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和蛋白质印迹法尚不能完全适应准确、及时的检测要求. 本实验通过筛选噬菌体七肽展示库^[1], 得到与 Bt 蛋白特异性结合的七肽, 并将其作为“类抗体”, 应用于抗虫转基因植物中 Bt 蛋白的检测, 从而初步建立了一种新的检测方法, 另外与 Bt 蛋白特异结合七肽的获得对研究 Bt 蛋白的结构与功能也具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 宿主菌和噬菌体随机七肽展示库: 大肠杆菌 ER2537 菌株和随机七肽噬菌体展示库购自 BioLabs 公司.

1.1.2 Bt 蛋白 CryIAc 和 LRP 蛋白: Bt 蛋白由自己构建的载体 pQEBt 在大肠杆菌中表达, 经 Ni-NTA 亲和层析纯化后获得, 纯度在 90% 以上. LRP 蛋白在本实验中作为一个带有 His-tag 的本底蛋白. Bt 与 LRP 蛋白均为带六个组氨酸的融合蛋白.

1.1.3 测序引物: -28 g III 测序引物序列为: gtatgggattttgctaacaac.

1.1.4 兔抗 M13 抗血清: 由中国科学院遗传研究所动物实验中心协助制备.

1.1.5 主要分子生物学、生物化学和免疫学试剂: T7 SequencingTM Kit 购自 Pharmacia 公司, 其他常用试剂和药品购自 Sigma 等公司或为国产.

1.2 方法

1.2.1 Bt 蛋白的表达载体构建、表达和提纯:

本实验室构建了载体 pQEBt, 转化了 *E. coli* M15. 诱导表达和提纯方法详见 QIAGEN 公司的 His-tagged 蛋白表达和纯化手册.

1.2.2 噬菌体滴度的测定: 方法见 BioLabs 公司 Ph. D.-7TM Phage Display Peptide Library Kit 手册.

1.2.3 噬菌体七肽库的竞争性淘筛: 以 Bt 蛋白作为目标蛋白, 以 LRP 蛋白和非转基因棉花总蛋白的混合物作为本底蛋白, 用 NaHCO₃ (pH 8.6) 稀释至 100 mg/L 后分别包被酶标板上两个孔, 4℃ 过夜, 封闭, 洗板. 将原噬菌体七肽库 10 倍稀释, 先加入本底蛋白包被孔, 孵育 1 h 后转移入包被有目的蛋白的孔, 再孵育 1 h, 洗板, 弃去孔中未结合的噬菌体. 加入洗脱液, 得到 Phage I-Bt. 将 Phage I-Bt 感染过夜培养的 ER2537 细胞, 扩增、纯化后重复上述淘筛过程两次, 分别得到 Phage II-Bt 与 Phage III-Bt. 详细方法见 Ph. D.-7TM Phage Display Peptide Library Kit 手册.

* 国家“863”生物高技术支持项目 (Z17-01-01), 并得到国际科学与文化中心 (ICSC) 世界实验室的部分资助.

** 通讯联系人.

¹⁾ 北京师范大学生命科学院, 北京 100875.

Tel: 010-62550187, E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2000-08-24, 接受日期: 2000-09-28

1.2.4 噬菌体 DNA 测序: 制备噬菌体单链 DNA 测序模板, 按照 Pharmacia T7 Sequencing™ Kit 操作手册进行测序。

1.2.5 结合肽的 ELISA 检验: 具体方法见 Ph. D.-7™ Phage Display Peptide Library Kit 手册。

1.2.6 转基因烟草植株: 转改造后的 CryIAC 基因烟草植株由本实验室秦红敏提供。

2 结 果

2.1 CryIAC 蛋白表达载体构建、表达和提纯

表达载体 pQEBt 和 pQELRP, 是将 1.8 kb 的 *BtCryIAC* 基因与一个病毒来源的 LRP 基因分别插入到 pQE30 的适当位点构建而成的 (资料略)。在大肠杆菌中表达后, 融合蛋白 His-Bt 和 His-LRP 经 Ni-NTA 亲和层析柱分别得到纯化, 融合蛋白 His-Bt 的纯化如图 1 所示。

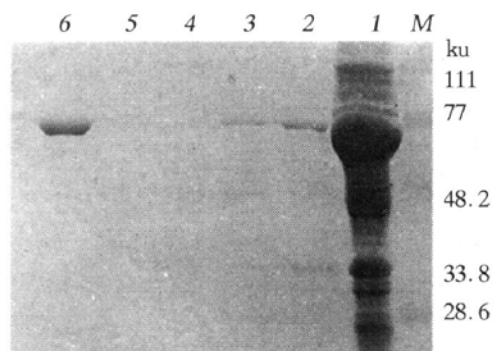


Fig. 1 Purification of Bt fusion protein by Ni-NTA agarose affinity chromatography

M: marker; 1: original extract; 2: buffer B; 3: buffer C; 4, 5: buffer D; 6: buffer E.

2.2 与 Bt 特异性结合的噬菌体七肽的淘筛

为消除 Bt 蛋白上带有的 His-tag 对淘筛的影响及降低植物 (棉花) 蛋白对 Bt 特异结合多肽的影响, 在用七肽库进行淘筛之前按材料与方法所述, 首先用带有 His-tag 的一个病毒蛋白 LRP 和棉花蛋白对七肽库进行吸附, 然后再对 Bt 蛋白进行吸附, 如此进行三轮淘筛, 对每轮所筛得的噬菌体均测滴度, 结果如表 1。以上结果可见在三轮“吸附-洗脱-扩增”的过程中, 与 Bt 蛋白结合的噬菌体百分收率增加了 10 000 倍, 证实了与 Bt 特异性结合的噬菌体七肽在筛选过程中得到了富集。将三轮所得噬菌体进行 ELISA 检测 (包被 Bt 浓度为 100 mg/L, 噬菌体稀释至 10^8 pfu/ml), 结果如图 2 所示, 表明经过三轮筛选后, 噬菌体与 Bt 特异性结合程度有了明显提高, 即得到了高度富集。

Table 1 Selective enrichment of phage peptide by Bt panning

Round of panning	Input/pfu	Eluted/pfu	Yield (Input: Eluted)
1	2×10^{13}	2.8×10^3	1×10^{-10} : 1.4×10^{-10}
2	5×10^{11}	3.6×10^4	1×10^{-8} : 7.2×10^{-8}
3	2.7×10^{11}	4.0×10^5	1×10^{-6} : 1.48×10^{-6}

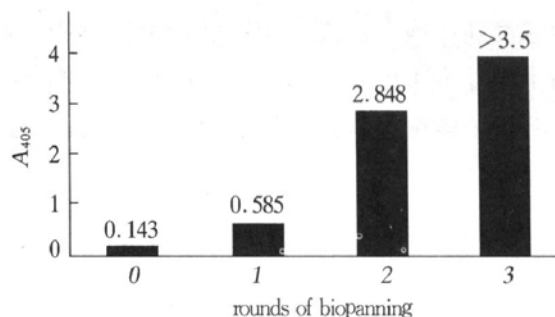


Fig. 2 Selective enrichment of phages from library by Bt protein during panning as determined by ELISA

0: control; 1~ 3: round number of biopanning.

2.3 特异性结合的噬菌体 DNA 序列分析

在第三轮筛选后, 对总库进行了测序, 测序结果进一步证明三轮筛选后特异噬菌体七肽库已明显富集 (图略)。从中随机挑选 7 个噬菌斑, 提取噬菌体单链 DNA, 对 7 个噬菌斑 DNA 以 28g III 为引物分别进行测序, 根据所测序列推测的七肽氨基酸序列见图 3:

```

1: GTA GGC TCA GTA TTA GTA GTC
   H  P  S  H  N  H  Q
2: TTA CCA AAC ATA TAA GGA ATC
   N  G  C  Y  I  P  Q
3: CTA GCA ACC GGC AAA AGC CTA
   D  R  W  P  F  S  D
4: GTA GGC TCA GTA TTA GTA GCC
   H  P  S  H  N  H  R
5: TTA CCA AAC ATA TAA GGA ATC
   N  G  C  Y  I  P  Q
6: TTA CCA AAC ATA TAA GGA ATC
   N  G  C  Y  I  P  Q
7: TTC ATA AAC TAC TAA GGA CTA
   K  Y  C  M  I  P  D
  
```

Fig. 3 Nucleotide sequence coding for the 7-peptide in the selected (No. 1~ 7) recombinant phages

序列分析结果表明: 2 号、5 号及 6 号克隆的七肽序列完全一致, 氨基酸序列为 NGCYIPQ, 其他特异噬菌体如 7 号与之也有一定的同源性, 但

同源性均较小. 将这些噬菌体分别命名为 PH1~PH7, PH2、PH5 及 PH6 因序列完全一致, 均以 PH5 表示, 并用于进一步的检测.

2.4 特异噬菌体与 Bt 结合的 ELISA 检测

各特异噬菌体溶液分别在滴度 10^5 pfu/ml 和 10^8 pfu/ml 时进行 ELISA 检测以比较特异结合的差异, 结果见图 4, 可见噬菌体 PH5 的 A 值明显高于其他几个克隆, 说明 PH5 的结合特异性最高. 特异噬菌体溶液在滴度为 10^8 pfu/ml 时的吸收峰明显高于滴度为 10^5 pfu/ml 时的吸收峰, 是由于特异结合的噬菌体浓度增大, 导致检测灵敏度提高.

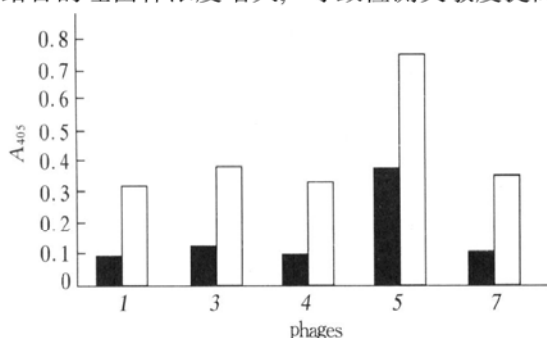


Fig. 4 Binding specificity of 5 recombinant phages selected as determined by ELISA

■: tit1 (10^5 pfu/ml); □: tit2 (10^8 pfu/ml).

固定 Bt 蛋白包被浓度为 100 mg/L, 以原库为阴性对照, 100 mg/L BSA 做空白对照, 将 PH5 按滴度梯度稀释, ELISA 结果如图 5, 可见 A 值随滴度的增加表现上升趋势, 即随滴度的提高结合性相应增大.

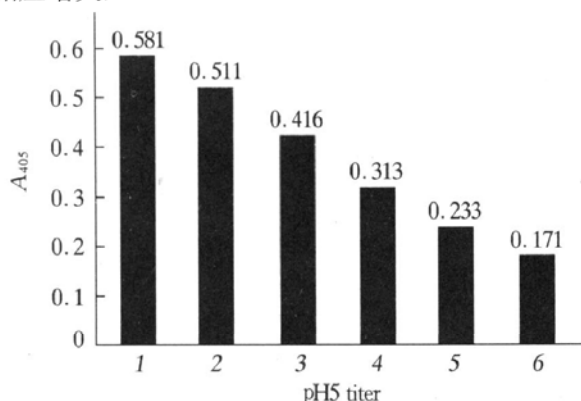


Fig. 5 Binding activity of Bt protein against pH5 with different titers as determined by ELISA

1~6: 10^{12} , 10^{10} , 10^8 , 10^6 , 10^4 , 10^2 pfu/ml.

固定 PH5 滴度为 10^8 pfu/ml, 将 Bt 浓度进行梯度稀释, 进行 ELISA 检测, 结果见图 6 所示, 由此可以认为: 当 PH5 为 10^8 pfu/ml 时, 可将

80 ng 左右的 Bt 检测出来. 由于植物蛋白提取液为 Na_2CO_3 缓冲液, 而我们包被蛋白所用为 NaHCO_3 , 溶液体系相近, 因此该体系应可直接用于抗虫转基因植物中 Bt 蛋白的检测.

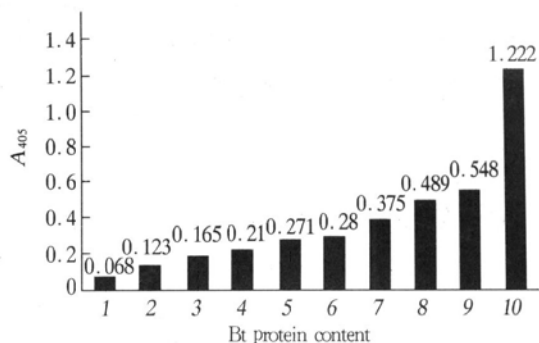


Fig. 6 Binding activity of PH5 against Bt protein with different content in plant extract buffer.

1: control; 2: 39 ng; 3: 78 ng; 4: 156 ng; 5: 312 ng; 6: 625 ng; 7: 1.25 μg ; 8: 2.5 μg ; 9: 5 μg ; 10: 10 μg .

2.5 转基因烟草的 ELISA 检测

利用 PH5 与 Bt 蛋白特异结合的性质, 对几株抗虫转基因烟草进行了初步检测, 结果均为阳性, 这一结果与秦红敏等对这些烟草进行分析的结果一致 (资料略), 证明该方法同样可用于转 Bt 杀虫蛋白基因植物的检测, 如图 7 所示.

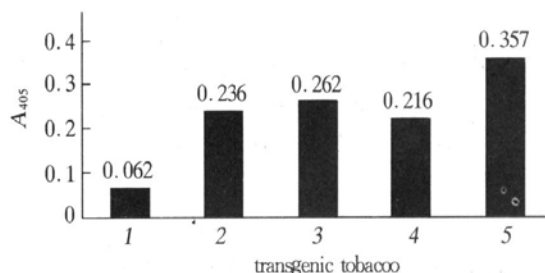


Fig. 7 Binding activity of PH5 against Bt protein in transgenic tobacco

1: control; 2~5: four different transgenic tobacco plants.

3 讨论

目前, 植物基因工程技术已逐渐应用于植物学的许多研究领域, 成为改良作物品种的一个重要途径. 对转基因植物进行鉴定和分析, 以确定外源基因在受体细胞基因组中的整合情况及在转录和转译水平上表达的情况涉及分子生物学的多项技术. 其中通过蛋白质印迹或其他免疫反应技术来检测外源蛋白表达情况是最重要的一步. 但由经典途径通过免疫动物筛选制备抗血清, 耗时长, 还需伤

害动物, 且每一批得到的抗血清效价和特异性均不同, 易造成实验误差.

本研究是利用 Phage Display 这一新的技术^[2,3], 将制备和纯化的 Bt 蛋白作为包被用“抗原”, 经过 3 轮“吸附-洗脱-扩增”的过程, 洗脱回收的特异噬菌体富集了 10 000 多倍^[4,5]. 在最后一轮淘筛后洗脱下来的 Phage 中随机挑选几个克隆, 进行特异性检验, 发现 PH5 可与 Bt 特异性结合. 对 PH5 与 Bt 在不同浓度下的特异性结合特性也进行了研究. 由此初步建立了一种检测苏云金杆菌杀虫蛋白的新方法, 该方法在抗虫转基因植物检测方面将会有一定的应用前景.

实验中利用噬菌体展示技术得到的 PH5 只有七个肽, 类似于 Bt 蛋白的单抗, 作用于 Bt 的一个抗原决定簇, 所以特异性很高. 另外其不仅容易保存, 而且可通过噬菌体扩增的方法大量制备. 现已有商品化抗 M13 的辣根过氧化物酶酶标抗体, 因此可以使检测更加方便, 而且不必制备抗体, 避免了抗体制备周期长, 特异性不高, 每一批滴度不一致, 纯化复杂以及需伤害动物等弊端. 对一般实验室来说, 噬菌体展示技术在转基因植物的检测中,

可望成为一种特异性高, 简便, 灵敏的常用方法, 而且不同批制品的免疫反应差异也比较一致. 但要形成一个成熟的实用化检测方法尚需对有关检测反应的一些条件进行更深入研究. 另外, 目前将噬菌体展示技术应用在植物分子生物学领域尚不多见, 本次实验不仅在转基因植物的检测方面建立了一种新的有应用前景的检测方法, 而且 Bt 蛋白特异结合的多肽对研究 Bt 杀虫蛋白的结构和功能也将具有重要意义.

参 考 文 献

- 1 Markland W, Roberts B L, Ladner R C. Selection for protease inhibitors using bacteriophage display. *Methods Enzymology*, 1996, **267**: 28~ 51
- 2 Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the Virion Surface. *Science*, 1985, **228** (4705): 1315~ 1317
- 3 Smith G P. Surface display and peptide libraries. *Gene*, 1993, **128** (1): 1~ 2
- 4 Jespers L S, Messens J H, De Keyser A, *et al.* Surface expression and ligand-based selection. *Bio/Technology*, 1995, **13** (4): 378 ~ 382
- 5 Cwirla S E, Peters E A, Barrett R W, *et al.* Peptide on Phage: a vast library of peptide for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (16): 6378~ 6382

Recombinant Phage-aided Detection of Bt Insecticidal Protein Expressed in Transgenic Plants^{*}

LI Li-Hong, LI Chang-Qing, HUANG Xiu-Li¹⁾, TIAN Ying-Chuan^{**}

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract CryIAC protein of *Bacillus thuringiensis* expressed in *E. coli* transformed with pQEBt was purified by Ni-NTA affinity chromatography. One phage (PH5) that binds specifically to Bt protein was selected from a combinatorial library of random 7-mer peptides fused to minor coat protein (p III) gene of the filamentous coliphage M13 through three cycles of biopanning and ELISA analysis. A new method of recombination phage aided detection of insecticidal Bt protein in transgenic plants was developed using PH5. The phages selected should also be useful in the structure study of functional domains of Bt insecticidal proteins.

Key words Bt toxin protein, phage display, ELISA

^{*} This work was supported by grants from the state “863” High-Tech Project (Z17-01-01) and partly by the World Laboratory of the International Center of Science and Culture (ICSC).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62550187, E-mail: tianyc@sun.im.ac.cn

¹⁾ College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875.

Received: August 24, 2000 Accepted: September 28, 2000