

国家自然科学基金重点项目 (31630061) 资助

苏云金芽孢杆菌Cry1类毒素 免疫广谱检测技术研究

焦凌霞 刘媛 刘贝贝 著

 中国农业出版社

国家自然科学基金重点项目 (31630061) 资助

苏云金芽孢杆菌 Cry1 类毒素 免疫广谱检测技术研究

焦凌霞 刘媛 刘贝贝 著

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

苏云金芽孢杆菌 Cry1 类毒素免疫广谱检测技术研究 /
焦凌霞, 刘媛, 刘贝贝著. —北京: 中国农业出版社,
2018. 8

ISBN 978-7-109-24464-1

I. ①苏… II. ①焦… ②刘… ③刘… III. ①苏云金
杆菌—类毒素—免疫测定—研究 IV. ①Q939.124

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 181554 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

责任编辑 王玉英

北京印刷一厂印刷 新华书店北京发行所发行
2018 年 8 月第 1 版 2018 年 8 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 3.5

字数: 110 千字

定价: 30.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

采用正负筛选方法，成功获得 6 株具有 Cry1Ab 毒素蛋白结合活性的阳性噬菌体单域抗体菌株，利用基因工程抗体易于定向修饰及 Cry 毒素具有相似结构的特点，以 Cry1Ab 毒素单域抗体基因为材料，通过同源建模及分子对接技术分析了 Cry1Ab 抗体与 5 种 Cry1 类毒素的关键氨基酸结合位点，以关键结合位点及其邻近位点为目标，利用 SPDBV 软件进行虚拟协同突变，预测亲和力及广谱性都有所提高的突变抗体，并通过定点饱和突变技术定向改造母本抗体构建突变抗体库；克隆表达了 Cry1 类毒素共性结构域，并利用共性结构域蛋白包被和多种 Cry1 类毒素交替包被筛选策略，获取了 5 个检测对象可覆盖多种 Cry1 类毒素的广谱抗体，比较分析突变抗体和母本抗体的亲和力及广谱性，探索广谱抗体识别区的分子结构特性，为建立高灵敏度多种 *Bt* Cry 毒素的免疫筛查方法和开发 Cry 毒素高效检测技术奠定基础。

前 言

在转苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) Cry 基因抗虫性作物不断出现和大面积推广并产生显著经济、社会和生态效益的情况下,携带 Cry 毒素植物的利用过程中存在的潜在生态环境和食品安全风险及隐患越来越受到公众、科研机构 and 政府等的关注。据报道,我国生产稻米中检测出的 Bt Cry 毒素基因和毒素产物对我国稻米出口和销售已经产生了不良影响,对转基因作物的安全性评价提出了严峻挑战。目前,克隆测序的 Bt 毒素基因已超过 400 个,可用于商业制剂或商业化转 Bt 基因作物的就多达十几类 (Cry1Aa、Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1C、Cry1D、Cry1E、Cry1F、Cry2Aa、Cry3A、Cry3B、Cry34/Cry35),安全监管的难度日益增加。目前,对转基因产品中毒素蛋白的检测主要采用针对单一毒素的抗体检测技术,方法滞后且检测效率低,Cry 毒素检测也存在同样的问题,但分子生物学技术的迅速发展为根据 Bt Cry 毒素三维构象相似的特点开发广谱检测技术奠定了理论和技术基础。因此,进行 Bt Cry 毒素广谱高效抗体的筛选和制备是解决转基因产品中 Cry 毒素蛋白高效筛查检测技术瓶颈问题的有效途径,具有重要的理论意义和实际应用价值。

基于相关领域的研究进展,本书在利用噬菌体展示技术从人源化噬菌体单域抗体库 (DAB) 中筛选获得抗 Cry1Ab 毒素单域抗体 (single domain antibody, sdAb) 的基础上,根据

Bt Cry 毒素三维构象相似的特点, 利用同源建模结合分子对接技术预测得到抗 Cry1Ab 毒素单域抗体和 5 类 Cry1 类毒素的共同关键氨基酸结合位点, 通过多位点协同饱和突变构建了大容量突变抗体库, 结合共性结构域包被和抗原交替筛选等广谱抗体筛选方法, 从单域抗体饱和突变库中筛选获得了五株对 Cry1 类毒素具有广谱识别活性的突变菌株, 为 *Bt* Cry 毒素广谱检测方法的开发奠定基础。

本书的出版得到国家自然科学基金重点项目 (31630061) 的资助, 同时得到江苏省农业科学院刘贤金教授的悉心指导, 在此表示衷心的感谢! 由于编者的专业水平有限, 书中疏漏之处, 恳请各位专家学者批评指正!

焦凌霞

2018 年 3 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
一、Cry 毒素的分类和命名	2
二、苏云金芽孢杆菌 Cry 毒素的结构与功能	3
三、苏云金芽孢杆菌制剂及其转基因产品存在的风险	4
四、苏云金芽孢杆菌 Cry 毒素检测技术	6
(一) 生物测定法	7
(二) PCR 扩增检测法	7
(三) 分子杂交技术	8
(四) 免疫学检测方法	9
五、抗体的发展	13
六、噬菌体抗体库技术	15
七、抗体基因的体外高频突变技术	19
第二章 人源化抗苏云金芽孢杆菌 Cry1Ab 毒素 单域抗体的筛选及活性鉴定	21
一、材料与方法	22
(一) 材料与试剂	22
(二) 方法	24

二、结果与分析	27
(一) 特异性重组噬菌体单域抗体的富集	27
(二) 单克隆 ELISA 方法筛选阳性重组噬菌体	28
(三) 菌液 PCR 结果	28
(四) 噬菌体单域抗体的氨基酸序列比对	29
三、讨论	30
四、结论	31

第三章 同源建模结合点突变技术构建单域

抗体定点饱和突变库	32
-----------	----

一、材料与方法	33
(一) 试验材料	33
(二) 实验方法	34
二、结果与分析	37
(一) 同源建模及分子对接	37
(二) 关键氨基酸结合热点分析	39
(三) 重叠延伸 PCR 结果	40
(四) 阳性克隆菌落 PCR 验证	41
(五) 重组子双酶切验证	42
(六) 突变库构建及鉴定	42
三、讨论	43
四、结论	45

第四章 苏云金芽孢杆菌 (Bt) Cry1 类毒素共性

结构域的分析定位	47
----------	----

一、材料与方法	48
(一) 材料	48

(二) 方法	49
二、结果与分析	50
(一) 序列比对	50
(二) 模板的确定和序列比对	51
(三) 同源建模及模型评价	52
(四) 5 种 Cry1 类毒素的模型比较	54
三、讨论	55
四、结论	56
 第五章 苏云金芽孢杆菌 (<i>Bt</i>) Cry1 类毒素共性 结构域的原核表达、纯化及鉴定	 57
一、材料与方法	58
(一) 材料	58
(二) 方法	59
二、结果与分析	61
(一) 共性结构域基因的克隆与序列分析	61
(二) pET-26b-Domain I 表达载体的构建及鉴定	62
(三) 共性结构域蛋白的表达与纯化	63
(四) Western blot、ELISA 和抗原性分析	64
三、讨论	65
四、结论	66
 第六章 Cry1 类毒素的广谱抗体筛选、鉴定及 广谱特异性分析	 67
一、材料与方法	67
(一) 材料	67
(二) 方法	69

二、结果与分析	73
(一) 抗 Cry1 类毒素的广谱抗体的筛选	73
(二) Cry1 类毒素广谱抗体阳性克隆的鉴定	74
三、讨论	78
四、结论	80
参考文献	81
附录	96
附录 1 试验培养基及相关试剂的配方	96
附录 2 核酸电泳相关试剂配方	97
附录 3 SDS-PAGE 相关试剂配方	97
附录 4 SDS-PAGE 操作步骤	98
附录 5 His Trap HP 镍亲和柱缓冲液试剂	99
附录 6 ELISA 试验所用缓冲液和试剂	100
附录 7 Western blot 试验所用缓冲液及试剂配方	101
缩写符号说明	102
后记	103

第一章 绪 论

苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 在稳定生长期形成的伴孢晶体蛋白, 又称杀虫晶体蛋白 (ICP) 或 δ -内毒素, 由 Cry 基因和 Cyt 基因编码, 是农业、林业和饮用水等领域用来控制靶标害虫、幼虫的有效工具。*Bt* 菌及其 Cry 毒素作为生物杀虫剂已安全使用 70 多年, 但关于其安全性一直存在争议。

研究认为, Cry 毒素对肠上皮细胞上具有特定受体的昆虫具有杀灭作用, 对非靶标生物如人类、大鼠等没有影响。但近年来的一些研究表明, Cry 毒素并没有人类想象的那么专一, 并非是绝对安全的。一些研究发现, Cry 毒素可以导致鲤鱼的免疫系统功能改变, 也可以直接作用于人类细胞, 引起抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡等作用。用转 *Bt* 基因水稻饲喂大鼠的实验表明, 转 *Bt* 基因水稻对于哺乳动物的非免疫器官与功能存在影响, 还可能导致哺乳动物的免疫器官和免疫细胞损伤。

随着生物技术的发展, 转 *Bt* 基因的农作物越来越多并大规模商业化, 与生活密切相关的有抗虫棉、抗虫水稻等, 由此引起的食品和环境安全性受到广泛关注, 越来越多的国家要求对产品进行转基因成分检测并实行转基因产品标签制度, 所以确定产品是否含有、含量多少以及含什么种类的转基因成分成为各国政府亟须解决的问题。因此, 建立快速、准确的 Cry 毒素广谱检测方法显得尤为重要。

一、Cry 毒素的分类和命名

苏云金芽孢杆菌能产生 7 种毒素蛋白, 其中杀虫晶体蛋白 (ICPs), 又称 δ -内毒素, 也称 Cry 毒素, 是苏云金芽孢杆菌在芽孢形成期菌体内一端或两端形成的晶体蛋白, 其含量可以占到芽孢形成过程中菌体产生总蛋白量的 20%~30% (Schnepf et al., 1990)。1989 年 Höfte 和 Whiteley 根据晶体蛋白的氨基酸序列和杀虫谱, 将已经发表的 42 种晶体蛋白分为 5 群 14 亚类 (Höfte et al., 1989)。其中具有溶血细胞作用的 27kDa 晶体蛋白基因被命名为 Cyt 基因, 其他只有杀虫活性的 13 亚类命名为 Cry 基因。Cry 基因可划分为四个群, 即 Cry I 为鳞翅目特异性, Cry II 为鳞翅目和双翅目特异性, Cry III 为鞘翅目特异性, Cry IV 为双翅目特异性。但随着新 Cry 基因不断被发现, 该分类系统在基因同源性和杀虫谱之间出现冲突。1995 年, 在国际无脊椎动物病理学年会上成立的杀虫晶体蛋白基因命名委员会提出只根据晶体蛋白氨基酸序列的同源性进行分类。以 45%、78% 和 95% 为界, 将 Cry 毒素蛋白基因分为 4 个分类等级, 依次用阿拉伯数字、大写英文字母、小写英文字母和阿拉伯数字表示。在新的分类系统中, 具有相同的第一级命名的毒素常常影响到属于同目的昆虫; 不同的二级命名表示不同的作用效力和范围; 第三级命名表示分散的点突变的积累; 第四级只表示与已知毒素稍有不同的毒素。四级命名适用于每个独立测序的毒素基因, 因而尽管一些物质有不同的命名, 它们可能实际上是相同的, 如 Cry23Aa1 和 Cry31Aa1 是同一种物质。按此命名规则, 可将已知的近 500 种 Cry 基因分

为 60 个大类，其中在转基因工程中应用最多的是第一大类中的 Cry1Ab，其次是 Cry1Ac 和 Cry1F。

Cyt 最早是在苏云金芽孢杆菌以色列亚种 (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, 简称 *Bti*) 的伴孢晶体中被发现的 (Guerchicoff et al., 2001)。到目前为止已发现的 Cyt 基因有 16 种，根据杀虫晶体蛋白基因命名委员会提出的新分类原则，Cyt 基因家族毒素分为两类，即 Cyt1 和 Cyt2。Cyt 蛋白具有广泛的溶细胞活性，在体外能够引起无脊椎动物和脊椎动物的细胞发生溶解，甚至能引起高等动物红细胞的溶解，即具有溶血活性。尽管 Cyt 蛋白在体外具有广泛的溶细胞活性，但是它的杀虫谱较窄，本身的杀虫活性也不高 (蔡峻和任改新, 2002)。

二、苏云金芽孢杆菌 Cry 毒素的结构与功能

目前，*Bt* 蛋白三维结构的解析方法主要有：单对或多对同晶置换法 (SIR/MIR) 和分子置换法 (MR) (Garfield et al., 1988)。现在有 7 种 Cry 毒素的三维结构经多对同晶置换法 X-衍射晶体图谱解析：Cry3Aa (Li et al., 1991)、Cry1Aa (Grochulski et al., 1995)、Cry2Aa (Morse et al., 2001)、Cry3Bb1 (Galitsky et al., 2001)、Cry4Aa (Boonserm et al., 2006)、Cry4Ba (Boonserm et al., 2005) 和 Cry8Ea (Guo et al., 2009)，通过分子置换法阐明了 Cry1Ac (Derbyshire et al., 2001; Li et al., 2001) 的结构。尽管这些毒素氨基酸序列的相似性很低，杀虫特异性各异，但它们的三维结构相似度很高，均由 3 个典型的结构域组成拓扑学结构 (Pardo-Lopez

et al. , 2013)。结构域 I (Domain I) 位于肽链的 N 端, 是一组由 6~7 个两亲的 α 螺旋围绕着一个疏水的 α 螺旋形成的 α 螺旋束, 参与了细胞膜的穿孔。结构域 II (Domain II) 位于肽链的中间, 为三组以“希腊钥匙”拓扑结构连接在一起的反平行的 β 折叠片层, 具顶端突环, 该突环参与毒素和受体蛋白的结合。位于 C 端的结构域 III (Domain III) 是由两组反平行的 β 折叠片层组成的夹心结构, 以 β 果酱卷拓扑结构排列, 其功能是防止蛋白酶对毒素分子的过度降解 (Höfte et al. , 1989)。

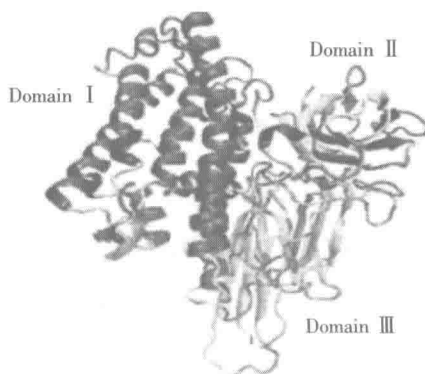


图 1-1 Cry 毒素的三维结构模拟图

三、苏云金芽孢杆菌制剂及其转基因产品存在的风险

全球持续的人口和消费增长意味着粮食需求量将至少增加 40 年, 确保农作物产量的可持续增加和食品安全是重中之重, 但由农业害虫造成的损失占全球农业生产总量的 14%~25% (Godfray et al. , 2010; DeVilliers et al. , 2011)。生物农药作为害虫综合治理 (IPM) 策略的一个重要组成部分, 主要致力

于降低由害虫引发的农作物产量损失和对环境有害的化学农药的使用。苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 多年来一直被用做控制以农作物为食的害虫幼虫, 并且在美国、欧洲及其他国家被广泛应用于经过认证的有机农业食品生产中。当昆虫幼虫食用喷洒有 *Bt* 制剂的农作物后, 杀虫晶体蛋白与昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜 (Brush Border Membrane Vesicles, BBMV) 受体结合, 插入膜内形成孔洞, 产生膜电压, 引起离子渗透平衡破坏, 使昆虫的上皮细胞裂解, 最后导致昆虫死亡 (Schnepf et al., 1998)。

苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) Cry 毒素蛋白以其特异性针对靶标昆虫、无残留污染和对非靶标生物安全等独特的优势, 在过去的 50 年内以微生物农药的方式被广泛应用于农业、林业和蚊虫控制等方面, 成为目前应用最成功的商业化微生物杀虫剂, 占生物农药生产量和使用量的 95% 左右。由于 *Bt* 微生物制剂受雨水、阳光等因素的影响, 因此其施用于植物叶子表面进行杀虫的效果将受到很大限制 (Federici et al., 2008)。随着生物技术的迅速发展, 将编码 Cry 蛋白的基因导入植物中已成为可能, Cry 蛋白在植物中进行表达, 进而保护农作物在整个生长期內免受虫害。虽然营养期杀虫蛋白 (VIP) 也已导入农作物, 但目前转基因 *Bt* 作物中最常使用的是 Cry 蛋白, 而 Cyt 蛋白还没有被引入商业化的 *Bt* 作物。

Bt 转基因作物已公布的生态风险包括转基因对非靶标生物的安全风险、导入基因对生态环境的性状表型影响、农作物的环境适度、潜在的侵袭性和杂草性, 以及不可预见的影响, 如次级代谢物水平的改变和食品安全。有关转基因作物对生态环境的影响也有报道 (Conner et al., 2003; Clark et al.,

2005; Andow et al., 2006; Carpenter, 2011)。针对转基因作物对非靶标生物的安全风险, 主要问题是 *Bt* 毒素可能对食用转基因作物的非靶标生物和摄取含毒素植物的有益害虫天敌有害。有研究通过室内和田间试验精确有效地评价了转 *Bt* 基因抗虫作物对非靶标生物 (O'Callaghan et al., 2004; Duan et al., 2010; Yu et al., 2011), 结果认为, 现有的转 *Bt* 基因抗虫作物对非靶标生物和生态环境是安全的, 没有不利因素存在。而且 Cry 毒素蛋白只有在靶标害虫的体内激活后, 在与中肠上皮细胞表面的蛋白受体特异结合后才能起到杀虫作用, 其他非靶标生物体内 (人类、小鼠和牛等) 都被证明缺乏这种特异性受体 (Lambert et al., 1996; Mendelsohn et al., 2003; Griffiths, 2005; Shimada et al., 2006)。很多发达国家的监管机构也证实了转基因 *Bt* 作物及其 Cry 毒素的表达产物在农作物和饮用水中残留的安全性。

四、苏云金芽孢杆菌 Cry 毒素检测技术

目前越来越多的国家要求对转基因产品实行标签制度。我国农业部颁布的《农业转基因生物标识管理办法》规定, 从 2002 年 3 月 20 日起, 凡是在中国境内销售的大豆、玉米、棉花及其制品, 若属转基因植物及其制品必须进行标识。因此对产品进行转基因成分检测, 确定是否含有、含量多少, 以及什么种类的转基因产品是摆在各国政府面前一项亟待解决的任务 (顾炜炜, 潘家荣, 2007)。对于 *Bt* 毒素蛋白的检测, 最早采用生物测定法, 该法由于存在极大的缺陷而被逐步淘汰。目前, 国内外对转 *Bt* 基因产品的检测方法主要有两种: 一是检

测插入基因 (Adugna et al., 2008), 二是检测表达蛋白 (Tripathi et al., 2005)。检测插入基因的方法有 PCR 法和核酸探针的杂交检测技术; 检测蛋白表达则主要采用免疫学检测方法 (ELISA 检测法、免疫试纸条法、免疫 PCR 法、蛋白芯片技术及 Western 杂交技术)、凝胶电泳、化学分析等方法。其中, 免疫分析检测技术是一种基于抗原—抗体特异性识别、结合反应的分析方法, 通过不同的标记方式, 实现对目的蛋白的定性定量检测, 具有简单、快速、灵敏、特异性高等特点, 并能在室内外实现高通量检测。

(一) 生物测定法

生物测定法是根据不同昆虫对 *Bt* 毒素蛋白的敏感性不同或者 *Bt* 毒素蛋白导致同一昆虫的不同死亡率来进行测定的 (Shirai et al., 2005; Andow et al., 2008)。该法的检测指标包括不同昆虫取食转 *Bt* 基因植株后的体重变化、羽化率、化蛹率和死亡率等情况。但是, 由于其试验操作十分繁琐, 需要大量虫源, 实验要求苛刻且检测结果准确性不高, 变异系数大, 数据可信度偏小。另外, 对苗期植株也会造成机械性的损伤, 影响后期正常生长。此法由于存在上述缺陷而被淘汰。

(二) PCR 扩增检测法

构建转基因作物时需要在表达载体中同时导入能在植物细胞中表达的各种启动子、终止子和标记基因等。PCR 检测技术可通过检测样品中是否含有外源启动子、终止子、标记基因、目的基因, 如抗病、抗虫、抗除草剂及抗逆等基因, 来判