

A DETERMINATION OF AVIDIN IN GENETICALLY MODIFIED PLANTS BY VOLTAMMETRIC TECHNIQUES

STANOVENÍ AVIDINU V GENETICKY MODIFIKOVANÝCH ROSTLINÁCH POMOCÍ VOLTAMETRICKÝCH METOD

Petrlová J.¹⁾, Mikelová R.^{1,2)}, Adam V.^{1,3)}, Havel L.⁴⁾, Kamer K. J.⁵⁾, Kizek R.¹⁾

¹Department of Chemistry and Biochemistry and ⁴Department of Plant Biology, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Theoretical and Physical Chemistry, and ³Department of Analytical Chemistry, Masaryk University Faculty of Science, Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

⁵Grain Marketing and Production Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Manhattan, KS 66502, USA

E-mail: jitap@centrum.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Quality assurance is a major issue in the food industry. The authenticity of food ingredients and their traceability are required by consumers and authorities. Plant species such as barley (*Hordeum vulgare*), rice (*Oryza sativa*), sunflower (*Helianthus annuus*), wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) are very common among the ingredients of many processed food products and are objects of interest of genetic modification (GMO); therefore the development of specific assays for their specific detection and quantification of GMO are needed. Furthermore, the production and trade of genetically modified lines from an increasing number of plant species brings about the need for control within research, environmental risk assessment, labeling/legal, and consumers' information purposes. Electrochemical sensors and biosensors based on modification of a surface of working electrode could be suitable tool for these purposes. Here, we report the using of a modified carbon paste electrode for rapid and sensitive determination of avidin in solution and in a transgenic maize extract. The process could be used to determine avidin concentrations up to 3 pM (100 amol in 3 µl drop) in solution and 174 nM in a maize seed extract. Moreover, we applied the method to analyze of different maize flours.

Keywords: Avidin, Maize, Square-wave voltammetry, Modified electrode, GMO.

ABSTRACT

Zajištění kvality potravin je hlavní úkol moderního potravinářského průmyslu. Možnosti zjištění pravosti jednotlivých složek potravin a schopnost jejich stanovení jsou v dnešní době vyžadovány nejen kontrolními orgány ale také konzumenty a výrobci. Rostlinné druhy jako ječmen (*Hordeum vulgare*), rýže (*Oryza sativa*), slunečnice (*Helianthus annuus*), pšenice (*Triticum aestivum*) a kukuřice (*Zea mays*) jsou nejčastějšími složkami potravinových produktů a jsou předmětem zájmu genetických modifikací (GMO). A proto je nezbytné vyvíjet specifické postupy pro detekci a kvantifikaci GMO. Navíc zvýšená produkce a obchodování

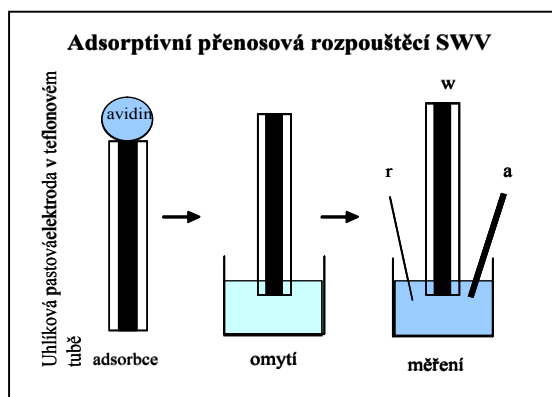
s geneticky modifikovanými druhy rostlin přináší potřebu informovanost zákazníka. Velmi vhodným nástrojem pro tyto účely mohou být elektrochemické senzory a biosenzory založené na modifikaci pracovního povrchu elektrody. V našich experimentech byla modifikovaná uhlíková pastová elektroda využita pro rychlé a senzitivní stanovení avidinu v roztoku v transgenních rostlinách kukuřice. Tento postup umožní stanovit avidin v koncentraci nižší než 3 pM (100 amol v 3 µl kapce) a 174 nM v extraktu semen transgenní kukuřice. Dále byla vyvinutá elektroanalytická metoda ověřena na analýze několika rozdílných kukuřičných mouk dostupných v obchodní síti.

Klíčová slova: Avidin, Kukuřice, Square-wave voltametrie, Modifikovaná elektroda, GMO.

ÚVOD

Avidin je minoritní složkou vaječného bílku plazů, obojživelníků a ptáků, jde o glykosylovaný a pozitivně nabitý protein (při neutrálním pH), který se obvykle vyskytuje ve formě tetrameru [1,2]. Pouze několik článků popisuje přímou detekci avidinu ve vejci. Na druhou stranu je avidin selektivně spojený s biotinem. Tento vitamín má velmi vysokou afinitu k avidinu (disociační konstanta 10^{-15} M), a této interakce je využito v mnoha typech avidin-biotin technologií, jako je imunohistochemie, elektronové mikroskopie, ELISA, DNA hybridizace a konstrukce biosenzorů [2-5]. Pro zabezpečení vhodné stravy pro expandující lidskou populaci je nezbytné využít nových technologií, které by mohli napomoci ke zvýšené produkci potřebných látek v zemědělských produktech a tedy i potravinách. Produkce kvalitních potravin je velmi často potlačena bakteriálními nebo virovými nemocemi, ale také poškozením způsobené hmyzími škůdci. Těmto nežádoucím procesům se může předcházet používáním chemických sloučenin, jako jsou pesticidy [6]. Avšak využití těchto sloučenin představuje významné riziko kontaminace životního prostředí a tím také umožňuje jejich vstup do potravního řetězce. Nové techniky molekulární biologie napomáhají výzkumu přirozených sloučenin pesticidů, které by byly produkovány rostlinami pro jejich vlastní ochranu vůči škodlivému hmyzu [7]. Teprve zcela nedávno, bylo zjištěno, že avidin je toxický pro široké spektrum motýlů, brouků, a dvoukřídlého hmyzu [8-11]. Za účelem bezchemické ochrany rostlin byly navrženy transgenní rostliny využívající biosyntézy avidinu. K tomu, aby bylo možné studovat expresi musely být navrženy nové bioanalytické postupy mezi, které je možné zařadit také elektroanalytické metody. Je známo, že uhlíková pastová elektroda (CPE) představuje vhodný nástroj pro konstrukci biosenzorů [12-15]. Navíc, uhlíková pastová elektroda může být jednoduše modifikována přidávkem rozmanitých sloučenin s cílem zvýšit senzitivitu, selektivitu a rychlost stanovení [4,16,17]. Zaměřili jsme se na využití uhlíkových elektrod (CPE a modifikovaná CPE) v kombinaci square-wave voltametrií a adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky pro měření nanogramového množství avidinu.

Obr. 1 Schéma adsorptivní přenosové voltametrie pro stanovení avidinu



MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Avidin, biotin, uhlíkový prášek, octan sodný, octová kyselina, minerální olej byl zakoupený od Sigma Aldrich Chemical Corp. (St. Louis, USA). Ostatní reagentie ACS čistoty byly zakoupeny od Sigma Aldrich. Roztoky byly připraveny za použití ACS vody od Sigma Aldrich. Zásobní standardní roztoky avidinu a biotinu $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ byly připraveny a skladovány ve tmě při 4°C . Všechny roztoky byly filtrovány přes $0.45 \mu\text{m}$ teflonový membránový filtr (MetaChem, Torrance, CA, USA). pH bylo měřeno za použití WTW inoLab Level 3 instrument (Weilheim, Německo), řízený pomocí osobního počítače a programu (MultiLab Pilot; Weilheim, Německo). pH-elektroda (SenTix H) pro kalibraci byl použit set WTW pufrů (Weilheim, Německo).

Elektrochemické měření

Elektrochemické měření bylo provedeno za použití Autolab analyzátoru (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Zurich, Švýcarsko). Systém elektrod je složen z uhlíkové pastové pracovní elektrody, Ag/AgCl/3 M KCl referentní elektrody a platinový drátek pomocné elektrody. Acetátový pufr ($0.1 \text{ M CH}_3\text{COOH} + 0.1 \text{ M CH}_3\text{COONa}$, pH 4.0) byl použit jako základní elektrolyt. Parametry pro adsorptivní transferová rozpouštěcí square wave voltametrii (AdTS SWV) byly následující: iniciační potenciál = $0,1 \text{ V}$, a potenciál = $1,3 \text{ V}$, amplituda = 25 mV , step potenciál = 5 mV , a frekvence = 200 Hz . Všechny pokusy byly provedeny při 25°C .

Příprava CPE a avidiem-modifikované CPE

Uhlíková pasta (kolem 0.5 g) byla vyrobena z grafitového prášku (Aldrich) a minerálního oleje. Podíl grafitového prášku a minerálního oleje byl testován. Tato pasta byla vložena do teflonového těla, diskový povrch měl průměr $2,5 \text{ mm}$ (Obr. 1). Po předešlém měření byl elektrodový povrch obnoven leštěním pomocí měkkého filtračního papíru.

Avidinem-modifikovaná CPE byla připravena již zmíněným postupem (viz výše), s přidavkem avidinu k CPE.

Příprava vzorků z transgenních rostlin

Konstrukce transgenních byla již dříve popsána našimi americkými kolegy [18]. Vzorky z transgenních rostlin asi deset gramů transgenních nebo ne-transgenních (kontrola) kukuřičných obilek bylo rozdrobeno během 1 min v kávovém mlýnku. Vzniklý prášek byl extrahován 1 h při 4°C za neustálého míchání v 50 ml pufru obsahujícího 50 mM uhličitanu sodného (pH 11,0), 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, a 0,05% (v/v) Tween-20. Extrakční směs byla centrifugována při 16 000 g po dobu 15 min (Jouan MR 23i) při 4°C. Supernatant byl odstraněn a filtrován. Filtrát byl opět centrifugován při 14 500 g po dobu 15 min při 4°C. Supernatant byl upraven na pH 10,5 a pak centrifugován při 14 000 g po dobu 30 min (Eppendorf 5402) při 4°C [4,18]. Výsledný supernatant byl následně použit pro přípravu modifikované CPE.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie avidinu na uhlíkové pastové elektrody

Z elektrochemického hlediska byla nalezena elektroaktivita pouze u tyrosinu (Y) a tryptofanu (W). Square-wave voltametrická analýza na pevné uhlíkové elektrodě není velmi senzitivní. Nicméně, použitím CPE s důmyslnou úpravou, jsme získali dobře rozlišený voltametrický signál jak pro Y tak i W 0.78 a 0.92 V vs. Ag/AgCl/3 M KCl. Píky byly studovány při koncentraci avidinu $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\sim 7 \mu\text{M}$) za použití adsorptivní přenosové rozpouštěcí square-wave voltametrie. Tato technika je založena na silné adsorpci avidinu na elektrodový povrch a následný elektrodový transfer, omytí elektrody a přesun do elektrolytu neobsahujícího avidin, kde bylo provedeno vlastní elektrochemické měření. Výhoda použitého postupu není jen v malém množství vzorku potřebného (6 a/nebo 3 μl kapka) pro voltametrickou analýzu. Stanovená výška píku byla lineárně závislá na době akumulace avidinu až do 2 min, nad tuto hodnotu výška píku klesá. Závislost na koncentraci avidinu byla studována v rozmezí koncentrací od 0 do $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Limit detekce ($3 \times S/N$) byl kolem $500 \text{ pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\sim 3 \text{ pM}$).

Elektrochemické chování avidinu v modifikované CPE

Avidin-modifikovaná CPE byla připravena jednoduše smícháním požadovaného množství avidinu s tradičně připravenými složením CPE grafitový prášek a minerální olej. Nejdříve jsme porovnali elektrochemické chování avidinu na uhlíkové elektrodě (CPE) a avidinem-modifikované CPE. Námi získaný výsledek je v dobré shodě s dalšími studiemi využívajících nemodifikovaných CPE [4,16] a ukazuje se, že avidin-modifikovaná CPE má podobné elektrochemické vlastnosti jako CPE. Také jsme zkoumali zda avidin může být uvolněn z pasty modifikované CPE elektrody do roztoku elektrolytu. Voltametrický signál se

sníží se asi o 15% (ve srovnání s původní výškou) během 20 min inkubace. Z těchto výsledků je jasné, že doba akumulace 2 min nebude mít zjevný vliv na výšku píku avidinu. Dále jsme studovali, zda voltametrický signál závisí na množství avidinu v avidin-modifikované CPE. Kalibrační křivka pro sledované koncentrační rozmezí byla lineární s lineární regresí $y = 1,00x + 9,04$ ($R^2 = 0,996$). Nižší koncentrace, při které byl voltametrický signál sledován pro naše experimentální podmínky, byl 10 ng.ml^{-1} avidin v avidin-modifikované CPE (700 pM ; R.S.D. = 3,4%, $n = 3$).

Stanovení avidinu v extraktu transgenní kukuřice pomocí avidin-modifikované CPE.

Moderní technologie genového inženýrství přináší nové možnosti ve způsobu přípravy rostlinných druhů produktů a zvýšené produkci proteinů (monoklonální protilátky, antigeny pro vakcíny, atd.). Nedávno byla připravena transgenní kukuřice, která produkuje avidin jako insekticid proti škodlivému hmyzu. V naší práci jsme smíchali extrakt obilí z transgenní kukuřice s uhlíkovým práškem. Tak byla připravena avidinu-modifikovaná CPE. Výška výsledného elektrochemického signálu odpovídá koncentraci avidinu vyskytujícího se ve vzorku kukuřice. Určovali jsme výšku píku avidinu v souvislosti se změnou množstvím extraktu z kukuřice přidaného k uhlíkovému prášku (R.S.D. = 7,8 %, $n = 3$). Pro analytické účely jsme sestavili kalibrační křivku, lineární závislost mezi koncentrací avidinu a objemem extraktu transgenní kukuřice ($y = 0,1611x - 0,1531$; $R^2 = 0,9923$). Výška píku voltametrického signálu se lineárně zvyšuje s přidáním extraktu do CPE od $15,6 \text{ } \mu\text{l}$ do $500 \text{ } \mu\text{l}$. Nejnižší detekovaný objem rostlinného extraktu byl kolem $15 \text{ } \mu\text{l}$, to odpovídá $2,5 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ avidinu ve vzorku. Když jsme testovali netransgenní rostliny byl pozorován velmi nízký signál. Pro ověření naší metody byly analyzovány extrakty řady vzorků komerčních kukuřičných mouk (mouka hrubá, krupice, a mouka hladká). Voltametrické signály získané z těchto vzorků byly také velmi nízké a jejich výška kolem 2-8% vůči signálům získaných z transgenních extraktů vzorků. Tento postup může být využit pro analýzu jiných transgenních produktů, které obsahují avidin, jako například v transgenní kukuřice, obilí, tabák a rýže [10,19].

Avidinem-modifikovaná CPE v přítomnosti biotinu

Interakce mezi avidinem a biotinem je jedna z nejsilnějších známých vazeb mezi proteinem a ligandem [20-23]. Hodnotili jsme vlastnosti avidin-modifikované elektrody v přítomnosti biotinu, který jsme přidali k základnímu elektrolytu a následně jsme sledovali voltametrickou odezvu avidinu. Udržovali jsme konstantní množství avidinu v avidinem-modifikované CPE a dobu akumulace ($10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$; 120 s) a měnila se koncentrace biotinu v elektrochemické cele od $0,5$ do $14 \text{ } \mu\text{M}$. Sledovali jsme voltametrický signál avidinu. Výsledný sledovaný pokles signálu avidinu po přidání biotinu byl způsoben skutečným formováním komplexu avidin-biotin komplexu, který může překrýt některé elektroaktivní tryptophany a tyrosiny v avidinu. Elektrochemický signál avidinu byl téměř nezjistitelný při

koncentraci biotinu 10 μM . Tvar výsledné křivky byl exponenciální ($y = 80,2 e^{-0.36x}$). Pro analytické účely jsme se pokusili oddělit koncentrační závislost do dvou částí. První část (koncentrace biotinu = 0 – 2 μM) byla striktně lineární ($y = -42,73x + 99,92$; $R^2 = 1$) a druhá část koncentrační závislosti byla: koncentrace biotinu = 2 – 10 μM s následujícími parametry: $y = -3,70x + 37,11$; $R^2 = 0,9907$; $n = 5$; R.S.D. = 5,9%.

ZÁVĚR

Navrhli jsme proteinem-modifikovanou voltametrickou bioelektrodu včleněním proteinu do CPE (avidin-modified CPE). Tato technologie nabízí řadu slibných možností na poli vývoje biosensorů pro detekci GMO a avidin-biotinové technologie.

Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podporována granty: GAČR 525/04/P132 a RASO 8/2005.

LITERATURA

- [1] N.M. Green Avidin, in: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall and F.M. Richards (Eds.), *Advances in Protein Chemistry*, Academic Press, New York, 1975, pp. 85-133.
- [2] M. Wilchek and E.A. Bayer Avidin biotin technology, *Methods Enzymol.* 184 (1990) 746.
- [3] L. Havran, S. Billova and E. Palecek Electroactivity of avidin and streptavidin. Avidin signals at mercury and carbon electrodes respond to biotin binding, *Electroanalysis* 16 (2004) 1139-1148.
- [4] M. Masarik, R. Kizek, K.J. Kramer, S. Billova, M. Brazdova, J. Vacek, M. Bailey, F. Jelen and J.A. Howard Application of avidin-biotin technology and adsorptive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2663-2669.
- [5] J. Wang, C. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P.A.M. Farias and N. Dontha DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2629-2634.
- [6] R.W. Silman Agrochemicals: Herbicides and pesticides, *Biotechnol. Adv.* 11 (1993) IN7-IN8.
- [7] B.R. Glicka and Y.W. Skofb Environmental implications of recombinant DNA technology, *Biotechnol. Adv.* 4 (1986) 261-277.
- [8] K.J. Kramer, T.D. Morgan, J.E. Throne, F.E. Dowell, M. Bailey and J.A. Howard Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests, *Natur. Biotechnol.* 18 (2000) 670-674.
- [9] K.J. Kramer Avidin, an egg-citing insecticidal protein in transgenic corn., in: G.H. Liang and D.Z. Skinner (Eds.), *Genetic Transformation in Crop Plants*, Haworth Press, New York, in press 2005.

- [10] N.P. Markwick, J.T. Christeller, L.C. Docherty and C.M. Lilley Insecticidal activity of avidin and streptavidin against four species of pest Lepidoptera, *Entomol. Exp. Appl.* 98 (2001) 59-66.
- [11] T.D. Morgan, B. Oppert, T.H. Czapla and K.J. Kramer Avidin and Streptavidin as Insecticidal and Growth-Inhibiting Dietary Proteins, *Entomol. Exp. Appl.* 69 (1993) 97-108.
- [12] J. Wang Stripping analysis, VCH Publishers, Deerfield Beach, 1985.
- [13] J. Wang, S. Bollo, J.L.L. Paz, E. Sahlin and B. Mukherjee Ultrace measurements of nucleic acids by baseline-corrected adsorptive stripping square-wave voltammetry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1910-1913.
- [14] J. Wang, C. Cai, J.R. Fernandes, D.H. Grant and M. Ozsoz Electrochemical measurements of oligonucleotides in the presence of chromosomal DNA using membrane-covered carbon electrodes, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4056-4059.
- [15] J. Wang, P. Grundler, G.-U. Flechsig, M. Jasinski, G. Rivas, E. Sahlin and J.L.L. Paz Stripping analysis of nucleic acids at a heated carbon paste electrode, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3752-3756.
- [16] J. Wang and M.S. Lin Mixed Plant-Tissue Carbon Paste Bioelectrode, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1545-1548.
- [17] W.W. Kubiak and J. Wang Yeast-based carbon paste bioelectrode for ethanol, *Anal. Chim. Acta* 221 (1989) 43-51.
- [18] E.E. Hood, D.R. Witcher, S. Maddock, T. Meyer, C. Baszczynski, M. Bailey, P. Flynn, J. Register, L. Marshall, D. Bond, E. Kulisek, A. Kusnadi, R. Evangelista, Z. Nikolov, C. Wooge, R.J. Mehig, R. Herman, W.K. Kappel, D. Ritland, C.P. Li and J. Howard Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification, *Mol. Breeding* 3 (1997) 291-306.
- [19] N.P. Markwick, L.C. Docherty, M.M. Phung, M.T. Lester, C. Murray, J.L. Yao, D.S. Mitra, D. Cohen, L.L. Beuning, S. Kuty-Amma and J.T. Christeller Transgenic tobacco and apple plants expressing biotin-binding proteins are resistant to two cosmopolitan insect pests, potato tuber moth and lightbrown apple moth, respectively, *Transg. Res.* 12 (2003) 671-681.
- [20] M. Wilchek and E.A. Bayer Introduction to avidin-biotin technology, *Methods Enzymol.* 184 (1990) 5-13.
- [21] M.S. Kulomaa, H.R. Nordlund, V.P. Hytonen, T.K.M. Nyholm, S.T.H. Uotila, E.J. Porkka and O.H. Laitinen Engineering of thermal stability and biotin binding of avidin, *Biophys. J.* 86 (2004) 95A.
- [22] K. Sugawara, S. Tanaka and H. Nakamura Electrochemical assay of avidin and biotin using a biotin derivative labeled with an electroactive compound, *Anal. Chem.* 67 (1995) 299-302.
- [23] E. Buckley, F.J.M. Alvarez, M.R. Smyth and K. O. R. Comparison of the adsorptive voltammetric behavior of avidin and streptavidin, *Electroanalysis* 3 (1991) 43-47.