

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

WILLIAN ELIAS PAULINO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS DE ELISA (*ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY*) PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS
CRY2A E VIP3A EM MILHO (*Zea mays* L.)**

PATOS DE MINAS – MG
AGOSTO DE 2021

WILLIAN ELIAS PAULINO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS DE ELISA (*ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY*) PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS
CRY2A E VIP3A EM MILHO (*Zea mays* L.)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes

PATOS DE MINAS – MG

AGOSTO DE 2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

P328 Paulino, Willian Elias, 1996-
2021 DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS DE ELISA (ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY) PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS
TRANSGÊNICAS CRY2A E VIP3A EM MILHO (Zea mays L.)
[recurso eletrônico] / Willian Elias Paulino. - 2021.

Orientador: Luiz Antonio Augusto Gomes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.516>

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. I. Gomes, Luiz Antonio Augusto, 1955-
, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

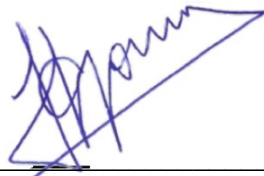
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS DE ELISA (*ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY*) PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS TRANSGÊNICAS CRY2A E VIP3A EM MILHO (*Zea mays* L.)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 13/08/2021

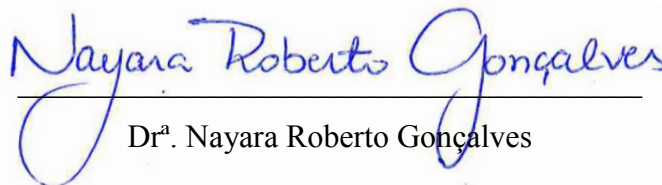
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luiz Antonio Augusto Gomes



Prof.ª. Dr.ª. Terezinha Aparecida Teixeira



Dr.ª. Nayara Roberto Gonçalves

Patos de Minas – MG

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que acreditam e defendem a ciência e a educação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por terem sido meus modelos de comportamento, me ensinando a discernir o que é certo e o que é errado, por terem me fornecido as coisas mais preciosas do mundo: amor, carinho, virtudes e proteção. Por toda a dedicação para que eu tivesse as oportunidades que eles não tiveram e me apoiarem nas minhas escolhas.

Ao meu irmão Joel e minha prima Maria Eduarda, por sempre serem os ouvidos quando eu precisei compartilhar meus segredos e frustrações, alegrias e tristezas, por estarem sempre comigo e por todo o carinho.

À minha família por me proporcionarem momentos fundamentais de apoio e união, me auxiliando quando eu precisei, por todas as boas memórias que carrego comigo, por serem presentes na minha vida e participarem da minha conquista e da minha história.

Ao Marciel, por ser meu companheiro de vida, por todo o amor, carinho, compreensão e me incentivar a acreditar que eu sou capaz de fazer mais do que eu geralmente penso.

Aos meus professores por mostrarem o caminho até o conhecimento e concederem mais do que o conhecimento em si, concederem experiência e sabedoria; agradecimento em especial ao professor Luiz e à professora Terezinha, por terem aceitado me orientar e se dispuserem a me auxiliar sempre.

Aos meus colegas de laboratório da KWS por vivenciarem comigo esta realização e por fazerem da rotina algo mais leve em suas companhias. Em específico, gostaria de agradecer ao João Lucas, à Nayara, à Natália Vaz, à Rafaela e à Vanisse por confiarem em mim na missão de conduzir estes experimentos.

À Camila, ao Gustavo e aos demais amigos, que nos momentos bons e ruins, demonstraram companheirismo e cujo convívio possibilitou um crescimento mútuo. Todos os gestos, contribuições e sentimentos de reciprocidade e empatia foram importantes para prosseguir e alcançar o objetivo.

Enfim, agradeço cordialmente a todos que participaram, direta e indiretamente, desta etapa decisiva na minha vida.

RESUMO

O milho (*Zea mays* L.) representa uma cultura anual de alto impacto econômico e social. Por ser afetada por diferentes pragas no campo, híbridos transgênicos resistentes a insetos foram rapidamente difundidos no mercado. As principais proteínas responsáveis por esta resistências são as proteínas da família Cry, como a Cry2a, e a proteína Vip3a. Para verificar a presença e expressão dos genes ou suas respectivas proteínas, diferentes métodos podem ser utilizados, sendo o teste ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) um deles. ELISA é baseado na interação antígeno-anticorpo e na reação da enzima ligada ao anticorpo com o seu substrato cromóforo, aonde a mudança de coloração indica que há presença da molécula-alvo. Os anticorpos utilizados no teste podem ser monoclonais ou policlonais. Existem diferentes tipos de ELISA, sendo o ELISA direto (sem anticorpo de captura) e o ELISA sanduíche (com anticorpo de captura) os mais comuns para analisar presença de antígenos. O objetivo deste trabalho foi testar e desenvolver um protocolo de ELISA sanduíche utilizando anticorpos policlonais para detectar expressão de Cry2a em sementes de milho e um protocolo de ELISA direto para detectar proteína Vip3a em sementes e plântulas de milho transgênico. Os anticorpos policlonais anti-Cry2a foram produzidos e isolados pela MyBiosource. As sementes foram trituradas, raízes e parte aérea de plântulas foram cortadas e adicionou-se solução-tampão para extração de proteínas destes tecidos. Foi testada a variação no volume de amostra, concentração de anticorpos de captura, concentração de anticorpo conjugado, volume de substrato e especificidade para a placa de ELISA Cry2a. Para montagem das placas de ELISA direto para Vip3a, foram testados volumes de amostra de diferentes tecidos e volume de conjugado aplicado. Os resultados demonstraram que o protocolo testado para ELISA sanduíche utilizando anticorpos policlonais foi sensível e específico na identificação de amostras que expressam a proteína Cry2a, porém os resultados de ELISA direto para detectar a proteína Vip3a foram inconsistentes e seria melhor desenvolver também um protocolo de ELISA sanduíche para esta proteína.

Palavras-chave: ELISA. Milho. Bt. Cry2a. Vip3a.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) represents an annual crop with high economic and social impact. As it is affected by different pests in the fields, insect-resistant transgenic hybrids were quickly disseminated in the worldwide market. The main proteins responsible for this resistance are the Cry family proteins, such as Cry2a, and the Vip3a protein. To verify the presence and expression of genes or their respective proteins, different methods can be used, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) is an example. Antibodies used in the assay can be monoclonal or polyclonal. There are different types of ELISA, the most common being the direct ELISA (without capture antibody) and the sandwich ELISA (with capture antibody) to analyze the presence of antigens. The aim of this work was to test and develop a sandwich ELISA protocol using polyclonal antibodies to detect Cry2a expression in corn seeds and a direct ELISA protocol to detect Vip3a protein in transgenic corn seeds and plantlets. Anti-Cry2a polyclonal antibodies were produced and isolated by MyBiosource. Seeds were crushed, roots and shoots were cut from plantlets and buffer solution was added to extract proteins from these tissues. Variation in sample volume, capture antibody concentration, conjugated antibody concentration, substrate volume and specificity for the Cry2a ELISA plate were tested. To assemble the direct ELISA plates for Vip3a, sample volumes from different tissues and applied conjugate volume were tested. The results demonstrated that the sandwich ELISA protocol using polyclonal antibodies was specific and sensible to identify Cry2a expression in maize seeds samples. However, the results for direct ELISA in order to detect Vip3a protein in samples were inconsistent and developing a sandwich ELISA protocol for this protein must be considered too.

Key words: ELISA. Maize. Bt. Cry2a. Vip3a.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Milho: características e impacto econômico e social.....	3
2.2 A cultura do milho	4
2.3 Milho transgênico.....	5
2.4 Proteínas Cry e Vip3a.....	6
2.5 Métodos de detecção de expressão de genes transgênicos	7
2.6 Teste ELISA.....	7
Test and protocol development for sandwich ELISA to detect Cry2a protein in transgenic maize seeds using polyclonal antibodies	11
Introduction	11
Experimental	13
Results and Discussion	16
Acknowledgments	22
Conflicts of Interest.....	22
References	22
Test and protocol development for direct ELISA to detect Vip3a protein in transgenic maize seeds and plantlets.....	24
Introdução.....	24
Experimental	26
Resultados e discussão	29
Referências.....	32
5 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no Brasil e no mundo, tornando-se uma base da alimentação animal e humana. A maior parte do milho plantado atualmente no Brasil corresponde a híbridos transgênicos. Estes híbridos são gerados a partir do cruzamento de linhagens endogâmicas, resultantes de longos processos de autofecundação, em que pelo menos um dos parentais seja portador de um evento transgênico.

A partir da descoberta e desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, o ser humano tornou-se capaz de inserir sequências de DNA exógeno no genoma de organismos vegetais, a fim de que os mesmos e seus descendentes expressem um fenótipo que naturalmente não é observado no germoplasma de sua espécie.

Em função da alta demanda na produção de milho, seja grão ou semente, os programas de melhoramento incorporaram genes provenientes de microrganismos ao genoma no milho, com o intuito de superar desafios no campo. Desta maneira, proteínas que conferem tolerância a herbicidas, como CP4-EPSPS e PAT, e resistência a lagartas, como as proteínas da família CRY e VIP3A rapidamente se difundiram na cultura desta espécie.

Considerando que a expressão destes genes confere vantagens às plantas no campo, as empresas responsáveis pela produção de sementes precisam atestar a presença destes eventos com o propósito de atender padrões internos de comercialização e fornecer sementes com alta pureza genética.

Por outro lado, em algumas regiões e países, é proibida a importação e plantio de sementes transgênicas da espécie, sendo assim, necessário certificar-se de que não há presença a nível significativo de proteínas transgênicas neste material.

Sendo assim, de quais maneiras é possível testar e verificar se uma semente, plântula ou planta de milho, ou qualquer outra espécie vegetal, se trata de um organismo geneticamente modificado?

Diversas metodologias já foram e continuam sendo desenvolvidas e otimizadas para identificar a presença ou expressão de genes e proteínas transgênicas. Algumas técnicas se baseiam na molécula de DNA, utilizando sondas de DNA, Southern Blot, marcadores moleculares juntamente com PCR e eletroforese ou PCR em tempo real. Outras análises se baseiam na expressão de proteínas, como Western Blot, imunocromatografia e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), por exemplo.

O teste ELISA baseia-se na interação antígeno-anticorpo e na reação de um substrato com a enzima ligada a um anticorpo. O teste tem como vantagens sua alta especificidade e

sensibilidade e a possibilidade de análise quantitativa ou qualitativa, porém a produção, isolamento e ligação dos anticorpos às enzimas possuem um custo elevado e requerem uma equipe técnica altamente capacitada e tempo; e estes anticorpos são bastante sensíveis, necessitando de armazenamento sob condições ideais de temperatura e/ou luz.

Empresas da área de biotecnologia comercializam kits para execução de testes de ELISA com procedimentos simples e com alta reprodutibilidade, porém com um custo financeiro agregado e poucas possibilidades de otimização.

Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um protocolo de ELISA sanduíche para detecção de proteína Cry2a em sementes de milho utilizando anticorpos policlonais customizados e também desenvolver um protocolo de ELISA direta para detecção de proteína Vip3a em sementes e plântulas de milho.

O desenvolvimento de protocolos para o teste de ELISA com a possibilidade de reprodutibilidade e simplicidade de execução similar aos protocolos de testes comercializados, porém com menor custo, seria uma hipótese de interesse para laboratórios e empresas que, por vezes, dependem de um único fornecedor.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Milho: características e impacto econômico e social

O milho (*Zea mays ssp. mays L.*) é uma planta alógama, monoica e monocotiledônea pertencente à família Poaceae (gramíneas). É uma cultura distribuída mundialmente e produzida em larga escala, sendo o cereal de produção mais expressiva no Brasil. O mesmo possui extrema importância na cadeia produtiva como matéria-prima de alimentos diretamente para o homem, assim como principal constituinte da ração animal. (Magalhães et al., 2002; Ono; Hirooka, 2003).

O Brasil é um grande produtor de milho, com crescimento anual na produção do grão. A estimativa inicial para o ano safra 20/21 era de 106,4 milhões de toneladas, porém em função da baixa ocorrência de chuvas, a estiva caiu para 96,4 milhões de toneladas, um decréscimo de 6% em comparação com o ano anterior (CONAB, 2021).

A razão pela qual o milho se tornou tão impactante na dieta humana e animal é por ser um alimento de alto valor energético, contendo até 72% de amido na composição do grão seco, além de proteínas, fibras e óleo (Paes, 2006). A tabela 1 ilustra a composição nutricional de grãos de milho avaliados pela Embrapa.

Tabela 1 - Resultados de análises químicas e experimentos de digestibilidade com diferentes partes de milho, na Embrapa Suínos e Aves.

Parâmetro	N	Média	Valor mínimo	Valor máximo
Matéria seca, %	489	87,68	82,69	91,97
Proteína bruta, %	637	8,49	6,43	10,99
Óleo, %	356	3,67	1,41	6,09
Cinza, %	305	1,15	0,24	2,00
Fibra bruta, %	362	2,25	1,10	3,48
Energia digestível, suínos, kcal/kg	21	3.472	3.211	3.567
Energia metabolizável, suínos, kcal/kg	28	3.421	2.952	3.937
Energia metabolizável, aves, kcal/kg	23	3.229	3.045	3.407
Ca, %	273	0,04	0,01	1,05
P, %	281	0,26	0,11	0,88
Mg, %	23	0,10	0,08	0,12
K, %	10	0,35	0,30	0,41
Na, %	3	0,00	0,00	0,00
Cu, mg/kg	47	4,65	0,91	19,39
Fe, mg/kg	43	58,67	22,48	182,30
Mn, mg/kg	44	7,34	1,10	20,00
Zn, mg/kg	47	27,39	13,93	151,88
Lisina, %	95	0,24	0,19	0,31
Metionina, %	74	0,21	0,14	0,27
Metionina + cistina, %	75	0,48	0,32	0,62
Treonina, %	92	0,27	0,22	0,33
Triptofano, %	119	0,05	0,02	0,14

Fonte: Cruz, 2011.

2.2 A cultura do milho

Algumas mudanças ocorreram na cultura do milho do século XX até os dias de hoje. Nos Estados Unidos, por exemplo, as primeiras plantas de milho difundidas territorialmente e plantadas em larga escala pertenciam a cultivares de polinização aberta foram predominantes até 1930 (Duvick, 2005).

Daí em diante, os híbridos se tornaram prevalentes nas grandes plantações, sendo que até 1960 os híbridos duplos predominavam sobre os demais híbridos. Na década de 1960, os híbridos simples modificados e os triplos adquiriram popularidade entre os agricultores. De 1970 até 1995, o plantio de híbridos simples se tornou quase unânime no país. De 1995 em diante, os híbridos transgênicos dominaram o mercado americano e mundial (Duvick, 2005).

2.3 Milho transgênico

Os conceitos para modificação genética e transgenia são bastante amplos e variados. De acordo com Halford e Shewry (2000), a modificação genética de plantas pode ser caracterizada como a alteração da estrutura, composição, ou desenvolvimento de plantas através da inserção de sequências de DNA específicas.

As plantas transgênicas, bem como suas biotecnologias e desenvolvimento, podem ser divididas em três gerações: a primeira geração como portadora de genes de interesse agrônomo como resistência a doenças, pragas, herbicidas, stress hídrico, etc; a segunda geração de transgênicos teve como objetivo alimentação funcional, com expressão de vitaminas e compostos a fim de enriquecer nutricionalmente os alimentos; e a terceira geração utiliza faz com que plantas produzam fármacos, vacinas, anticorpos e hormônios, por exemplo (Garg et al., 2018; Rocha; Marin, 2011).

Tratando-se do milho, o cultivo e produção se enquadram quase totalmente na primeira geração de transgênicos. Os híbridos transgênicos se estabeleceram na cultura do milho nos Estados Unidos a partir de 1995, majoritariamente híbridos Bt (*Bacillus thuringiensis*) para a resistência à broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis* Hubner), que era a maior praga dentro do *corn belt*, região produtora de milho nos Estado Unidos, na época (Duvick, 2005).

O desenvolvimento de cultivares transgênicas com os genes Bt é um exemplo de sucesso no melhoramento de plantas para a resistência aos insetos. O primeiro cultivar transgênico Bt foi lançada em 1995 nos EUA para controle da broca, uma batata com expressão do gene *cry3A*, cujo produto proteico tem a capacidade de matar larvas de insetos por se ligar a células do seu intestino e provocar a lise (Datta, 2007), possibilitando a redução de 40% do uso de inseticidas na cultura deste tubérculo. Pouco tempo depois, o mesmo gene foi introduzido em algodão e milho (Borém; Miranda, 2013).

De acordo com o Conselho de Informações sobre Biotecnologia, o primeiro cultivar de milho transgênico no Brasil foi aprovado no ano de 2007. Segundo o último levantamento anual de culturas transgênicas, feito pela *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications* (ISAAA) referente ao ano de 2017, 15,6 milhões de hectares de milho transgênico foram plantadas no Brasil, de maneira que 88,9% de todo o milho produzido em território nacional corresponde a híbridos transgênicos (CIB, 2019). A figura 1 apresenta a distribuição percentual das principais características de interesse agrônomo em híbridos e linhagens de milho no Brasil

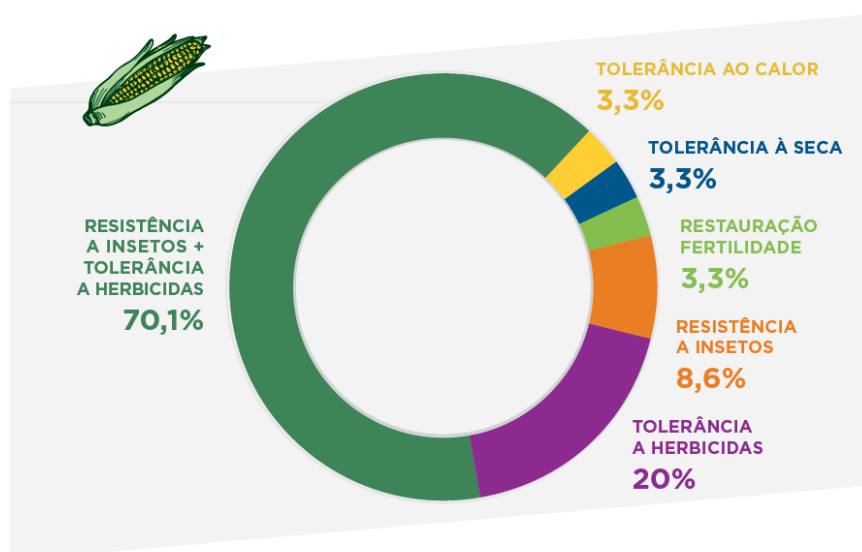


Figura 1. Distribuição percentual das características dos eventos de milho aprovados no Brasil. **Fonte:** CTNBio, <https://maissoja.com.br/desmistificando-o-milho-transgenico/>. **Acesso:** 24 de julho de 2021.

2.4 Proteínas Cry e Vip3a

A maior parte de genes transgênicos que codificam proteínas de resistência a insetos presentes no milho são oriundos de *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria encontrada na natureza, cujas proteínas produzidas durante a sua esporulação apresentam propriedades entomopatogênicas, como as proteínas Cry (Bravo et al. 2007).

As proteínas Cry, nomenclatura abreviada de *Crystal* em função da sua estrutura cristalizada, representam uma família de δ -endotoxinas com alta similaridade filogenética e com domínios que interagem com receptores no sistema gastrointestinal de lepidópteros e coleópteros, formando poros no intestino médio destes insetos (Parker; Feil, 2005).

Da mesma maneira, o gene que codifica a proteína Vip3a foi identificado em *Bacillus thuringiensis*, especificamente na estirpe AB88; e que, apesar de também ser tóxica para lepidópteros, a proteína possui um modo de ação diferente, de maneira que, seus receptores no intestino dos insetos são bastante distintos dos receptores das proteínas Cry (Estruch et al, 1996).

2.5 Métodos de detecção de expressão de genes transgênicos

A fim de testar a qualidade, pureza e segurança de vegetais geneticamente modificados, diferentes métodos foram desenvolvidos para detectar ou identificar, de maneira qualitativa ou quantitativa, a ocorrência ou expressão de genes transgênicos (Conceição et al., 2006).

A utilização de primers e marcadores para identificação destes genes após amplificação por PCR e eletroforese, são um exemplo de detecção de presença de transgenes em um genoma. Este tipo de teste tem alta repetibilidade, facilidade de execução e baixo custo relativo (Guimarães et al., 2009).

Quando a reação de amplificação de DNA é realizada pelo método de PCR em tempo real, ainda há a possibilidade de quantificar o número de cópias do gene ou sequência de DNA testada. Porém, independente da técnica, métodos baseados na análise de DNA apenas informar que ali existe a sequência alvo, porém não é possível determinar a respeito de sua expressão a menos que obtenha-se uma cópia de DNA a partir de RNA (Fletcher et al., 2014).

Testes de bioensaio analisam diretamente a expressão do fenótipo de interesse, oferecendo o estímulo ou condição que se deseja testar e observando a resposta após o tempo determinado, o que simularia o que será observado em larga escala, porém tanto a expressão do fenótipo quanto a análise do teste estão sujeitos à influência do ambiente (Torres et al., 2003).

E, temos os testes de detecção de proteínas, como o Western Blot, cromatografias, imunocromatografias e ELISA (Conceição et al., 2006).

2.6 Teste ELISA

O teste ELISA é um teste imunoenzimático utilizado para detecção de anticorpos ou de antígenos. Esta metodologia é amplamente utilizada para diagnóstico clínico e detecção de infecções como hepatite, HIV e mais recentemente, COVID-19 (Torane. Shastri, 2008; Dhamad; Rhida, 2020).

O teste se baseia na relação entre antígeno e anticorpo. Os anticorpos, ou imunoglobulinas, são proteínas secretadas a partir de linfócitos B após o contato com moléculas estranhas, ou antígenos, de maneira que os anticorpos reconhecem e se ligam especificamente a regiões destes antígenos, chamadas de epítomos. Por isso, ensaios que utilizam anticorpos são de alta especificidade (Crowther, 1995).

Para análise visual ou fotométrica, os anticorpos usados para detecção são ligados a enzimas que, em contato com determinados substratos, apresentam mudança na coloração. Majoritariamente, a intensidade de coloração pode ser correlacionada com a expressão da proteína-alvo, seja um antígeno ou anticorpo (Crowther, 1995).

Existem diferentes tipos de teste ELISA, sendo os principais: direto, indireto e sanduíche (Crowther, 1995).

O ELISA direto consiste na fixação do conteúdo proteico da amostra, aplicação do anticorpo com enzima e reação com substrato, para detecção da presença de antígeno. É uma metodologia mais barata e rápida, considerando que é feita em menos etapas e utiliza apenas o anticorpo conjugado à enzima, porém é menos sensível que os demais métodos, principalmente quando o antígeno possui baixa expressão (Crowther, 1995).

O ELISA indireto é utilizado para detectar a presença de anticorpos na amostra. O antígeno é fixado à placa, a amostra é aplicada e os anticorpos presentes se ligam ao antígeno, em seguida o anticorpo de detecção e o substrato (Crowther, 1995).

O ELISA sanduíche é oposto ao método indireto. O anticorpo é fixado aos poços da placa, a amostra é adicionada e em seguida os anticorpos conjugados, se houver antígeno presente na amostra, o anticorpo de detecção se mantém no poço após lavagem e a enzima reage com o substrato (Crowther, 1995).

O ELISA tipo sanduíche pode utilizar anticorpo primário de detecção ligado ou não à enzima. Quando este não é conjugado, então se inclui no processo um anticorpo secundário com enzima e que se liga ao anticorpo primário (Crowther, 1995).

A figura 5 abaixo ilustra as diferenças entre os principais métodos de ELISA, esquematizando as etapas e reagentes utilizados.

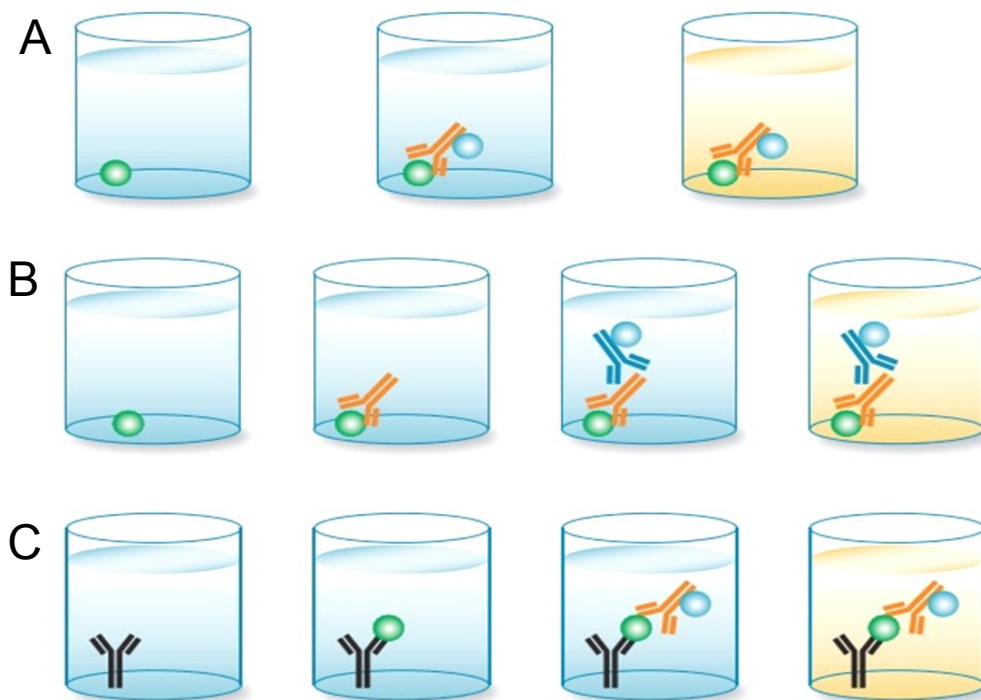


Figura 5. Diferentes metodologias de ELISA. **A.** ELISA direto. **B.** ELISA indireto. **C.** ELISA sanduíche. **Fonte:** <<https://www.hhub.com.br/noticias/metodo-elisa>>. **Acesso** em: 24 de julho de 2021.

Os anticorpos utilizados para captura e detecção do antígeno podem ser monoclonais ou policlonais. Para obter anticorpos policlonais, o antígeno é injetado mais de uma vez em um animal, como um coelho, e depois os anticorpos são isolados do soro deste animal após o tempo necessário para resposta imune. Desta maneira, os anticorpos são obtidos de diferentes clones de linfócitos B e reconhecem diferentes epítopos de um mesmo antígeno (Lipman et al., 2005).

Já a produção de anticorpos monoclonais, o antígeno é injetado uma vez no animal. Linfócitos B são isolados do baço do animal e fundidos com células de mieloma, criando um hibridoma. Este hibridoma é mantido em cultura e os anticorpos são produzidos enquanto estas células crescem e se reproduzem. Os anticorpos então são purificados desta cultura de hibridoma. Estes anticorpos monoclonais são obtidos de um único clone de linfócito B e reconhecem somente um epítipo (LIPMAN et al., 2005).

No teste de ELISA, ambos os tipos de anticorpos apresentam vantagens e desvantagens diferentes. Anticorpos monoclonais apresentam reconhecimento de altíssima especificidade, repetibilidade e previsibilidade do ensaio, mínima reatividade cruzada e facilidade de purificação; porém, por serem muito específicos, podem não reconhecer o

antígeno se ocorrer qualquer alteração na sequência ou estrutura do epítopo (Ascoli; Aggeler, 2018).

Já os anticorpos policlonais podem ser obtidos de maneira fácil e com baixo custo, apresentam alta afinidade, estabilidade molecular e abrangência de reconhecimento, porém pode apresentar variabilidade entre lotes produzidos e é preciso verificar se há reatividade cruzada antes de validar seu uso (Morikawa et al., 1995; Ascoli; Aggeler, 2018).

Assim, o tipo de anticorpo mais indicado para cada teste varia de acordo com o as características do analito e a condução da análise (Morikawa et al., 1995).

Existe uma gama de enzimas passíveis de utilização no teste de ELISA, porém as mais comumente empregadas na conjugação com o anticorpo são a HRP, *Horseradish Peroxidase*, e PAL, fosfatase alcalina. Estas enzimas são capazes de reagir a mais de um substrato cromóforo e se mantêm estáveis ligadas ao anticorpo (Konstantinou, 2017).

Test and protocol development for sandwich ELISA to detect Cry2a protein in transgenic maize seeds using polyclonal antibodies

Willian E. PAULINO,^{***†} Natália R. V. CARDOSO,^{**} Luiz A. A. GOMES,^{*} João L. G. COSTA^{**}

^{*} *Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Patos de Minas 38700-128, Brazil*

^{**} *Seeds Analysis Laboratory, KWS Seeds Inc., Patos de Minas 38700-973, Brazil*

[†] To whom correspondence should be addressed.

E-mail: willianelias81@gmail.com

Cry proteins represents a family of δ -endotoxins, produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt), which cause harm towards insects larvae and their death. The Cry genes are widely used in crops, such as maize. Different molecular methods can be used to detect those genes in transgenic crops, ELISA is an example. In this work, a sandwich ELISA protocol was tested using polyclonal antibodies to detect Cry2a presence in maize seeds. In trial to develop optimal reagent usage, variations in sample and TMB substrate volumes and antibodies concentrations were tested. After establishing the conditions of 100 μ L of sample volume, 1.80 μ g/mL of capture antibody, 1.08 μ g/mL of HRP-conjugate antibody and 100 μ L of TMB, the protocol was tested in Cry2a and non-Cry2a maize seeds samples. The data obtained indicated the assay was specific and sensitive to detect presence and expression of Cry2a protein in maize seeds.

Key words: ELISA. Cry proteins. Bt maize. Polyclonal antibodies.

Introduction

Bacillus thuringiensis (Bt) is a bacteria whose pathogenic capacity towards insects was discovered about 1911.¹ This entomopathogenic activity occurs due to δ -endotoxins those bacteria produce in their sporulation cycle. Based in their crystal structure, they received the name Cry. They can also be called Bt proteins.²

Various Cry proteins have already been identified and molecularly described. Those proteins have conserved domains, which present similarities in their structure and function. Those sites link to receptors present in the microvilli of lepidopteran, coleopteran and dipteran

larvae's intestines and form pores on the cell's membrane, causing their lysis. Because of this, those bacteria have been and still are used for biological control of pests.³

Considering how interesting those proteins' potential is on the agronomical point of view, Cry genes were inserted on the potato's genome, and a little later in crops like cotton, soybean and maize, creating genetically modified organisms with resistance to insects.⁴

Maize (*Zea mays* L.) is one of the species with most transgenics production and planted area, especially of Bt biotechnology. This enabled the crop, a good management a control of pests in fields, like *Helicoverpa* spp, using less insecticide, thus helping to keep biodiversity and reducing the pollution of water and soil.^{5,6}

In crop breeding and production process of transgenic seeds, it's important to test and ensure that plant material actually possess the transgenic trait as informed. Different methodologies can be used, by analyzing the phenotype itself as bioassays or by molecular techniques based in analysis of DNA or protein. The ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) assay is an example of method used to verify the presence and expression of transgenic proteins in maize.⁷

To verify if the sample is positive or negative for the analyte's presence, detection antibodies linked to an enzyme are added to the plate's wells. After washing the plate, a substrate is added. If the substrates presents color changing or light emission, it means that the conjugated antibody remained in plate well, because it's bound to the target molecule. Therefore, that sample is positive.⁸

For identification of transgenic proteins in plants, the most used ELISA methodology is the sandwich ELISA. The capture antibody is coated on the plate and, if the antigen is present, to the end of the assay's steps, there will be an antibody-antigen-antibody complex, similar to a sandwich.⁹

The antibodies used in ELISA assay might be monoclonal or polyclonal. The polyclonal

antibodies are purified from serum of an animal that was consecutively exposed to the antigen, and multiple clones from B lymphocytes secreted antibodies that recognize different parts of the antigen, called epitopes.¹⁰

The use of polyclonal antibodies on ELISA assay has the advantage of low cost and production time, high affinity and tolerance to sequence and/or structure changes on the antigen, however variability on the assay and cross reactivity with non-target protein may happen.¹¹

The aim of this work was to test ELISA plates using polyclonal antibodies for analysis of Cry2a expression in maize seeds, in order to establish an optimized, specific and sensitive protocol for this assay.

Experimental

Antibodies

The capture and detection antibodies for Cry2a were produced and isolated by the company MyBiosource.com. Both antibodies are polyclonal, were extracted from rabbits serum, purified and lyophilized, so resuspension in PBS (phosphate-buffer saline) solution was necessary. The detection antibody is linked to the HRP enzyme, Horseradish Peroxidase, which react to many different substrates.

After resuspension, the antibodies were diluted in PBS 0.01M, so the concentration of capture and detection antibody were 360 µg/mL and 54 µg/mL, respectively.

Cry2a protein, used as control, was also synthesized and isolated by MyBiosource.com.

Plant material and protein extraction

The Cry2a and non-Cry2a maize seed samples were given by KWS Seeds Inc (KWS Saat SE & Co.).

In Eppendorf® Deepwell Plate 96/2000 μL , one seed from the samples was put inside each well until all plate was filled, verifying if there were no empty wells or wells with more than one seed.

Using multichannel micropipette, 150 μL of distilled water were added to each well of the plates and those were incubated overnight in seed germinator at 40° C, so they would soak and their mechanical resistance would decrease.

Stainless steel spheres of 7mm diameter were inserted in each well of the plates and those plates were taken to the hydraulic press for 96-deep wells plate, in purpose of crushing the seeds. The use of steel spheres avoids direct contact between the press and the samples, avoiding contamination between samples.

The spheres were removed by cautiously leaning the plate and then, whole seeds were searched in it. When intact seeds were found, they were manually crushed manually, using a tweezer and sterilizing it with ethanol 70% V/V.

In each well, 900 μL of extraction buffer solution were added (PBS 1X, NaCl 0.138M, KCl 0.0027M, Tween-20 1%, pH 7,4). The minimum time for protein extraction was 1 hour at 25 °C and the maximum storage time was 24 hours at 25 °C, 48 hours at 4 °C or 96 at -4 °C.

Capture antibody coating

The capture antibody was diluted at 1.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in coating buffer solution (carbonate-bicarbonate 0.5M) and 100 μL were applied in each well of Greiner Bio-One 96-well high-binding ELISA plates. The plate was sealed with film adhesive and incubated overnight at 4 °C.

The plates were washed in microplate washer, for 2 cycles of washing with 200 μL of washing buffer solution (PBS 1X, 0.5% Tween-20). This washing process was repeated between each of the following steps of this procedure.

Plate blocking and sample application

The blocking of the plates was done by adding 100 μL of non-fat milk powder solution (3% m/m in PBS 1X) in each well and incubating overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. This step is crucial, once it blocks empty spaces where other molecules could bind and cause cross-reactivity and/or false-positive signals. The proteins present on milk, like casein and albumin, must not have had cross reactivity with anti-Cry2a antibodies.

Past the plate blocking, 100 μL of sample aliquot were applied to plates and, then again, they were incubated overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$.

Plate readout

The detection antibody was diluted at 0.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS buffer and 100 μL of the antibody was pipetted. The plates were sealed and incubated overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$.

After the washing step, 100 μL of TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) substrate were poured in each well of the ELISA plate. The plates were stored in a clean, dry and lightless place for 10 minutes, for the reaction between enzyme and substrate.

The plates were analysed in the MultiskanTM FC Microplate Photometer, using 620 nm of wave length. Then the stop solution (HCL 1M) was applied and the plate was again read in the MultiskanTM equipment with 450 nm of wave length.

Variables testing

First, the sample volumes of de 50 μL , 100 μL , 150 μL and 200 μL were tested, keeping the other measures and concentrations reported in the procedure above.

Then, a plate was tested with different capture antibody concentrations, such as 0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (direct ELISA method), 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Further, the influence of detection antibody concentration was assayed by using 100 μL at 0.27 $\mu\text{g/mL}$, 0.54 $\mu\text{g/mL}$, 1.08 $\mu\text{g/mL}$ and 50 μL conjugate from Envirologix® Qualiplate kit.

Finally, 50 μL , 100 μL , 150 μL and 200 μL of TMB substrate were used to verify its response in results.

Specificity testing

After variables testing, the specificity of this ELISA protocol was put to test by using Cry2a sample aliquots and non-Cry2a sample which Express Vip3a, Pat and M-EPSPS.

Statistical analysis

The statistical analysis and graphic plotting was made using the software GraphPad Prism 9. Analysis of variance and Tukey's test were executed in order to find out if the means were significantly different from each other, with 95% of confidence interval ($p < 0,05$).

Results and Discussion

Variables analysis

By testing different sample aliquot volumes, it was possible to observe the saturation in the plate with 50 μL of sample. The absorbance reading at 620 nm, for the blue color of TMB, and at 450 nm for the yellow color after application of stop solution, generated a matrix with very similar values. A statistical analysis of means and standard deviation for the optical densities (OD) of the sample volumes of 50 μL (1.62 ± 0.29 OD 620 nm, 2.00 ± 0.39 OD 450 nm), 100 μL (1.60 ± 0.38 OD 620 nm, 2.11 ± 0.45 OD 450 nm), 150 μL (1.56 ± 0.31 OD 620 nm, 2.03 ± 0.59 OD 450 nm) and 200 μL (1.67 ± 0.48 OD 620 nm, 2.13 ± 0.60 OD 450 nm) as shown in Fig. 1A and 1B, demonstrated that there was no significant difference between the

sample means.

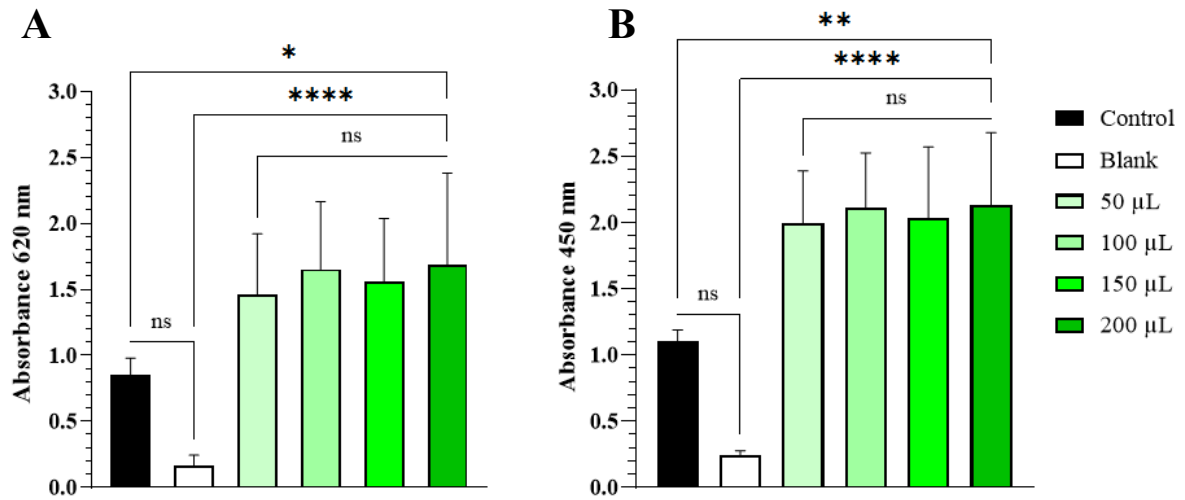


Fig 1. Absorbance results for sample volumes variation in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. ns, *, **, **** mean, respectively, no significant difference, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$.

In order to detect Aflatoxin in maize flour samples from Kenya through ELISA assay, Mutiga et al. (2014) used a 100 μL -aliquot from protein extract obtained by adding NaCl and methanol to samples. The volume used by these authors were sufficient to precisely determine the concentration of Aflatoxin in samples.¹²

When testing the variation in concentrations of capture antibody, a difference in staining was observed only in the wells where the sample was directly applied (0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of capture antibody), obtaining a mean optical density value equal to 0.85 ± 0.39 at 620 nm and 1.01 ± 0.39 at 450 nm, while the plate lines with 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtained mean absorbance results in the range of 2.0 OD. Fig. 2 below demonstrated those results.

This result reinforces the idea that the direct ELISA has a lower sensitivity when compared to the sandwich ELISA, especially in cases where the antigen has low or variable expression.¹³

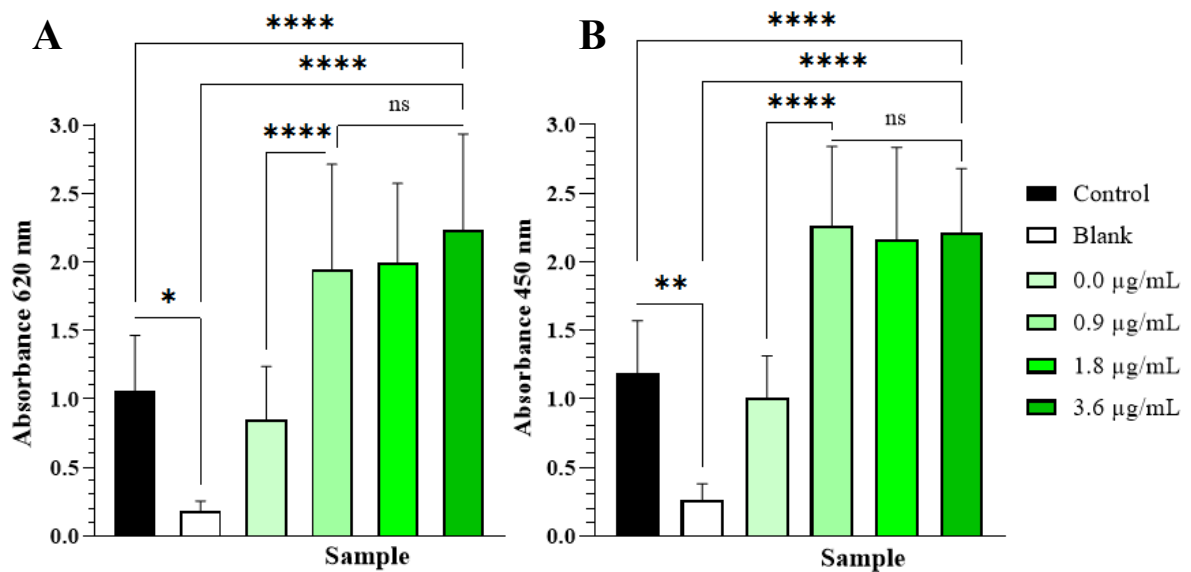


Fig 2. Absorbance results for capture antibody variation in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. ns, *, **, **** mean, respectively, no significant difference, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$.

Varying the concentration of the conjugate, it was observed the formation of a color gradient whose intensity is directly proportional to the concentration of the antibody.

Comparison of mean absorbance at 620 nm for wells tested with detection antibody variation, shown in Fig. 3A. At a concentration of $0.27 \mu\text{g/mL}$ (1.06 ± 0.30 OD) and $0.54 \mu\text{g/mL}$ (1.73 ± 0.70 OD), the means were considered statistically equal. Means between $0.54 \mu\text{g/mL}$ and $1.08 \mu\text{g/mL}$ (2.25 ± 1.13 OD) were also considered equal, but between $0.27 \mu\text{g/mL}$ and $1.08 \mu\text{g/mL}$, the means were statistically different ($p < 0.001$). All absorbance means for the different concentrations of polyclonal antibody detection were lower and statistically different from the mean obtained using the commercial conjugate (3.07 ± 0.48 OD).

However, when analyzed after the addition of stop solution, the absorbance means at 450 nm (Fig. 3B) at concentrations of $0.27 \mu\text{g/mL}$ (1.21 ± 0.41 OD), $0.54 \mu\text{g/mL}$ (1.92 ± 0.70 OD), $1.08 \mu\text{g/mL}$ (2.57 ± 0.88 OD) and the commercial conjugate (3.36 ± 0.62 OD) were all considered statistically different from each other.

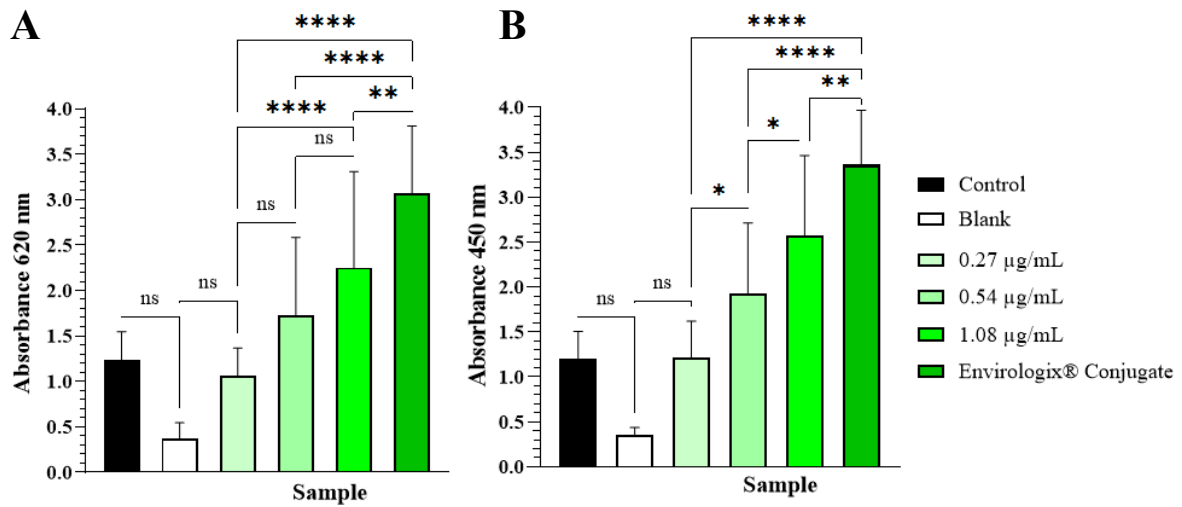


Fig 3. Absorbance results for conjugate antibody variation in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. ns, *, **, **** mean, respectively, no significant difference, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.0001$.

Considering that there was saturation and homogeneity varying the sample volumes applied and the capture antibody concentration, this linear increase in the mean absorbance is an indication that the detection antibody concentration may have been a limiting factor in previous tests. In this way, the amount of conjugated antibodies inserted into a well is a determining point for the sensitivity of the test.

Yet, a dark background in the well is not advantageous, once, depending of the equipment used to run the plate reading, the peaks of signal might surpass the limits for absorbance reading.

Liu et al. 2020 used 100 µL of capture and detection monoclonal antibodies at concentration of 2.0 µg/mL and 1.0 µg/mL, respectively, to develop a sandwich Elisa protocol to detect Vip3Aa in Mir162 maize samples. These amounts were enough to detect the antigen with a range of 31.25–500 pg/ml Vip3Aa proteins concentration.¹⁴ In this work, it was proved that concentration lower than those might be used to detect Cry2a protein in maize using polyclonal antibodies, which indicates again that polyclonal antibodies might be more sensitive in ELISA assays.

By varying the volume of the substrate, the opposite was observed, but in a slighter way.

The color was more intense where the substrate volume was smaller and lighter where the substrate volume was greater.

Absorbance means between tested wells with 50 μL (2.249 ± 0.312 620 nm OD, 2.494 ± 0.492 450 nm OD), 100 μL (1.701 ± 0.367 620 nm OD, 1.869 ± 0.508 450 nm OD), 150 μL (1.482 ± 0.415 620 nm OD, 1.436 ± 0.506 450 nm OD) and 200 μL (1.482 ± 0.415 620 nm OD, 1.436 ± 0.506 450 nm OD) were different from each other when analyzed at 450 nm (Fig 4B), but at 620 nm only the wells with 50 μL of substrate showed statistical difference in relation to the others substrate volumes (Fig. 4A).

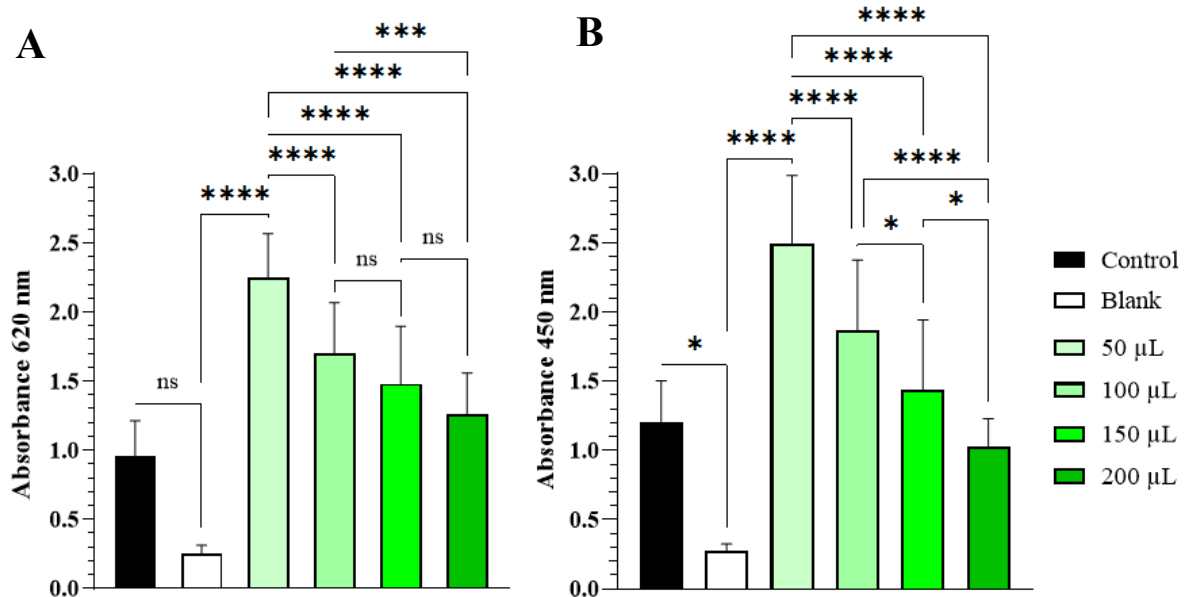


Fig 4. Absorbance results for substrate volumes variation in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. ns, *, ***, **** mean, respectively, no significant difference, $p < 0.05$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$.

Specificity test

The specificity test was very positive, indicating little or no cross-reactivity, since the mean absorbance of the non-Cry2a sample (0.214 ± 0.209 620 nm OD, 0.322 ± 0.438 450 nm OD) was statistically equal to negative control (0.190 ± 0.035 620 nm OD, 0.240 ± 0.035 450 nm OD).

The transgenic Cry2a sample (1.855 ± 0.458 620 nm OD, 2.148 ± 0.334 450 nm OD) had a higher absorbance mean than the positive control (0.717 ± 0.063 620 nm OD, 0.767 ± 0.134 450 nm OD) and the other samples, with $p < 0.001$ in most of the compared means. All those results are displayed in Fig 5.

The standard deviation observed in non-Cry2a samples was due to a positive seed for Cry2a. This result could be verified by rapid testing using paper immunochromatography strips.

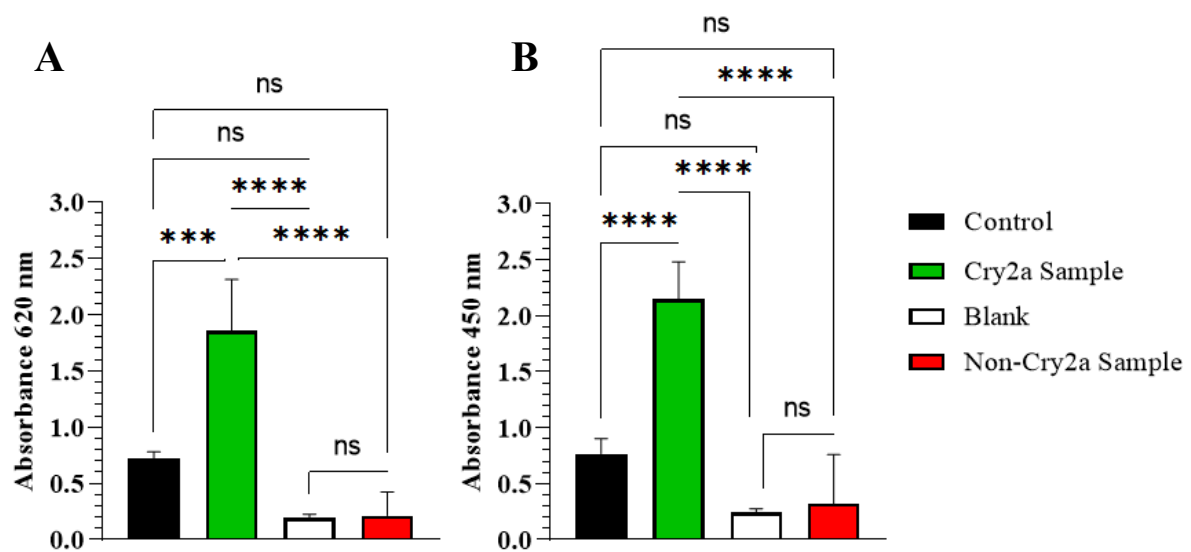


Fig 5. Specificity assay for Cry2a samples. Absorbance measures in wave-length of (A) 620 nm and (B) 450 nm. ns,***,**** mean, respectively, no significant difference, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$.

Dong et al. 2020 tested the specificity of VL-VL antibodies for detection of Cry1 proteins and also obtained mean absorbance at 450 nm between 2.0 and 2.5 for specific antigens, while the results for Cry2a, Vip3 and CBS were below 0.5. The results obtained in this work were similar.

Therefore, the ELISA test protocol using anti-Cry2a polyclonal antibodies proved to be specific and sensitive to analyze the expression of Cry2a in maize seeds.

Acknowledgments

This work was financially supported by KWS Seeds Inc. (KWS SAAT SE & Co. KGaA) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel).

Conflicts of Interest

Part of the authors is employed by KWS Seeds Inc., which financially supported this work and may use the results and methodology in its analysis processes.

References

1. R. C. Reardon. *Bacillus thuringiensis for managing gypsy moth: a review*, **1994**, 1.
2. M. W. Parker and S. C. Feil. *Progress in biophysics and molecular biology*, **2005**, 88.1, 91-142.
3. A. Bravo, S. S. Gill, and M. Soberon. *Toxicon*, **2007**, 49.4, 423-435.
4. D. N. Duvick. *Advances in agronomy*, **2005**, 86, 83-145.
5. S. O. Duke. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59.11, 5793-5798.
6. S. Kumar, A. Chandra, and K. C. Pandey. *J Environ Biol*, **2008**, 29(5), 641-653.
7. F.R. Conceição, Â. N. Moreira, and P. C. Binsfeld. *Ciência Rural*, **2006**, 36(1), 315-324.
8. J. R. Crowther “ELISA: *theory and practice*.” **1995**, Vol. 42. *Springer Science & Business Media*.
9. R. Kumar and M. Aizawl. *Senhri Journal of Multidisciplinary Studies*, **2016**, 1.1, 6.
10. N. S. Lipman et al. *ILAR journal*, **2005**, 46(3), 258-268.
11. C. A. Ascoli and B. Aggeler. *BioTechniques*, **2018**, 65(3), 127-136.
12. S. K. Mutiga et al. *Phytopathology*, **2014**, 104(11), 1221-1231.
13. K. Shah and P. Maghsoudlou. *British journal of hospital medicine*, **2016**, 77.7, C98-C101.

14.W. Liu et al. *Biotechnology letters*, **2020**, *42.8*, 1467-1478.

15.S. Dong et al. *Food Analytical Methods*, **2020**, *13*, 1570-1582.

Test and protocol development for direct ELISA to detect Vip3a protein in transgenic maize seeds and plantlets

Willian E. PAULINO,^{***†} João L. G. COSTA^{**}

* *Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Patos de Minas 38700-128, Brazil*

** *Seeds Analysis Laboratory, KWS Seeds Inc., Patos de Minas 38700-973, Brazil*

[†] To whom correspondence should be addressed.

E-mail: willianelias81@gmail.com

Maize (*Zea mays* L.) represents a crop with widely use of insect-resistant transgenic hybrids, as it is affected by different pests in the fields. Vip3a, originally secreted by *Bacillus thuringiensis*, is one of the proteins responsible for this resistance. To verify the presence and expression of genes proteins, different methods can be used, like ELISA. Direct ELISA might detect antigen's presence without capture antibodies. In this work, a direct ELISA protocol was tested to detect Vip3a protein in transgenic maize seeds and plantlets. Seeds were crushed, roots and shoots were cut from plantlets and buffer solution was added to extract proteins from these tissues. To assemble the direct ELISA plates for Vip3a, sample volumes from different tissues and applied conjugate volume were tested. The results obtained for direct ELISA in order to detect Vip3a protein in samples were inconsistent and developing a sandwich ELISA protocol for Vip3a must be considered.

Key words: ELISA. Vip3a. Bt maize.

Introdução

O milho (*Zea mays* L.) como é atualmente, assim como muitas espécies cultivadas, é o resultado da intervenção direta do ser humano, selecionando características que atendam seus interesses. Este processo é conhecido como melhoramento genético vegetal. A seleção de indivíduos com fenótipos superiores é feita baseado no princípio de que os genes serão verticalmente transferidos para a próxima geração.^{1,2}

Porém, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, métodos foram desenvolvidos para que genes de interesse fossem transferidos horizontalmente de uma espécie para outra, originando indivíduos transgênicos.^{3,4}

Isto revolucionou a produção de milho mundialmente, pois foi possível obter rapidamente linhagens e híbridos com características como tolerância a herbicidas, tolerância ao stress hídrico e resistência a insetos, a partir de genes de microrganismos.^{5,6}

Para produzir as primeiras plantas de milho resistentes a pragas do campo, foram inseridos genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produzem proteínas capazes de degradar severamente o trato intestinal de lagartas, levando os insetos à morte após ingestão de tecidos da planta. Estas proteínas são chamadas de Cry.^{7,8}

Muitas proteínas Cry estão aprovadas como eventos transgênicos para o milho, porém a quebra de resistência é uma realidade. Muitos indivíduos da espécie *Spodoptera frugiperda* são resistentes a proteínas Cry, por exemplo.⁹

Outra proteína de *Bacillus thuringiensis* com capacidade patogênica a insetos foi isolada e estudada anos após o lançamento dos milhos Bt. Vip3a é uma proteína que, apesar de causar danos similares aos insetos quando ingerida, possui sequência, estrutura e receptores totalmente distintos.¹⁰

Se tratando de uma biotecnologia mais recente, quando comparada à CP4-EPSPS ou Cry, existem ainda muitas metodologias a serem desenvolvidas e otimizadas para identificação da presença de Vip3a em milho.

Esta identificação e análise da expressão são importantes para que os programas de melhoramento e a produção comercial de sementes possam verificar se há segregação do evento dentro de um campo ou lote ou se esta expressão satisfaz padrões de qualidade e pureza genética, bem como órgãos reguladores do setor agropecuário e alimentício precisam verificar o percentual de proteínas transgênicas na composição de vegetais e alimentos.¹¹

O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é um exemplo de método usado para verificar a presença e expressão de proteínas transgênicas no milho.¹¹ O ELISA direto consiste na fixação do conteúdo proteico da amostra, aplicação do anticorpo com

enzima e reação com substrato, para detecção da presença de antígeno. É uma metodologia mais barata e rápida, considerando que é feita em menos etapas e utiliza apenas o anticorpo conjugado à enzima, porém é menos sensível que os demais métodos, principalmente quando o antígeno possui baixa expressão.¹²

O objetivo deste trabalho é desenvolver um protocolo de ELISA direto para detecção de Vip3a em plântulas e sementes de milho transgênico.

Experimental

Material vegetal e extração de proteínas

As amostras de sementes de milho portadoras de biotecnologia foram cedidas pela empresa KWS Sementes.

Em placa *deep well* de 96 poços com capacidade de 2 mL, foi colocada uma semente por poço, verificando se não haviam poços vazios ou poços com mais de uma semente.

Utilizando micropipeta multicanal, adicionou-se 150 µL de água destilada em cada poço das placas e estas foram incubadas em germinadores em período *overnight* a 40 °C, para que embebessem e diminuíssem sua resistência mecânica.

Foi inserida uma esfera de 7 mm de diâmetro, feita de aço inoxidável, em cada poço das placas e estas foram levadas para a prensa hidráulica de 96 dentes para trituração das sementes. A utilização das esferas de aço impede o contato direto dos dentes da prensa com as sementes, evitando a contaminação entre uma amostra e outra.

As esferas foram removidas inclinando cuidadosamente a placa e então, foi observado se haviam sementes inteiras. Quando foram observadas sementes inteiras, estas foram trituradas manualmente, utilizando uma pinça e esterilizando-a em álcool 70% entre cada semente triturada.

Para obtenção de plântulas, as sementes foram germinadas por 6 dias em rolo de papel, umedecido a 2,5 L de água/kg de papel, à uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.

A excisão de tecido da parte aérea da plântula e da raiz primária foi realizada através de corte com lâmina de bisturi, realizando a assepsia da lâmina em álcool 70% entre cortes. Os explantes foram dispostos em poços de placa *deep well*.

Foram adicionados 900 μL de solução-tampão de extração (PO_4^{3-} 0,01M, NaCl 0,138M, KCl 0,0027M, Tween-20 1%, pH 7,4) em cada poço da placa. O tempo mínimo para extração de proteínas foi de 1 hora a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o armazenamento máximo foi de 24 horas a 25°C , 48 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou 96 horas se congelado ($-4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

As placas *deep well* contendo tecidos de plântulas foram congeladas *overnight*, pois a formação de cristais de água causa a lise das membranas plasmáticas, aumentando a exposição do conteúdo intracelular.

Aplicação de alíquota da amostra

De cada um dos tecidos vegetais testados, foram aplicados os volumes de 50 μL , 100 μL , 150 μL e 200 μL (tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente) em placas de ELISA de 96 poços de alta afinidade, da marca Greiner Bio-One.

Foram adicionados 50 μL de solução-tampão carbonato-bicarbonato 0,5M, a fim de auxiliar na fixação das proteínas da amostra aos poços. Foram utilizados 50 μL de controle positivo da proteína Vip3a, comercializado pela empresa Envirologix®. Como controle negativo, foram utilizados 50 μL de solução-tampão de extração. As placas foram seladas e incubadas em período *overnight* a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As placas foram lavadas em máquina lavadora de microplaca de 96 poços com 200 μL solução-tampão PBS com 0,5% de Tween-20 por dois ciclos de lavagem. Este processo de lavagem se repetiu entre cada etapa do procedimento.

Bloqueio da placa

O bloqueio das placas foi feito adicionando 100 μL de solução 3% m/m de leite em pó desnatado em solução de PBS e incubando *overnight* a 4 °C. Esta etapa é importante, pois bloqueia espaços que possivelmente não estariam ocupados com o anticorpo, evitando resultados imprecisos.

Após o bloqueio das placas, aplicou-se o volume de 100 μL de alíquota da amostra extraída e as placas foram novamente incubadas em período *overnight* a 4 °C.

Leitura da placa

Testaram-se os volumes de 50 μL (a) e 100 μL (b) de solução de anticorpo de detecção, comercializada em kits de ELISA pela empresa Envirologix, em poços com os volumes de amostra testados.

A ambientação do conjugado nos poços foi feita agitando suavemente as placas em movimentos circulares. As placas foram seladas e armazenadas a 4 °C em período *overnight*.

Após a etapa de lavagem, 100 μL de substrato TMB foram adicionados a cada poço das placas de ELISA. As placas foram reservadas em ambiente limpo, seco e ao abrigo da luz por 10 minutos para reação da enzima com o substrato.

As placas então foram analisadas na leitora de placas de ELISA Multiskan™ FC *Microplate Photometer*, utilizando comprimento de onda de 620 nm.

Então foi aplicada a solução *stop* (HCl 1M) e a placa foi novamente lida no equipamento Multiskan™ com comprimento de onda de 450 nm.

Análise estatística

A análise estatística e criação de gráficos foi feita utilizando o software GraphPad Prism 9. Foi executada a análise de variância e teste de Tukey para testar igualdade entre as médias, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

A análise quantitativa da placa de ELISA montada com amostras de sementes de milho com biotecnologia Vip3a apresentou variações entre as leituras de absorbância nos comprimentos de onda de 620 nm e 450 nm. O apêndice I traz o resumo dos resultados obtidos desta análise.

As médias foram consideradas estatisticamente diferentes entre os volumes de amostras aplicados quando a densidade óptica foi medida a 620 nm, porém não foram observadas diferenças entre diferentes volumes de conjugado dentro de um mesmo volume de amostra (Fig 1A). Contudo, após aplicar a solução stop e realizar a leitura a 450 nm, os resultados obtidos não indicaram diferença entre as médias (Fig 1B).

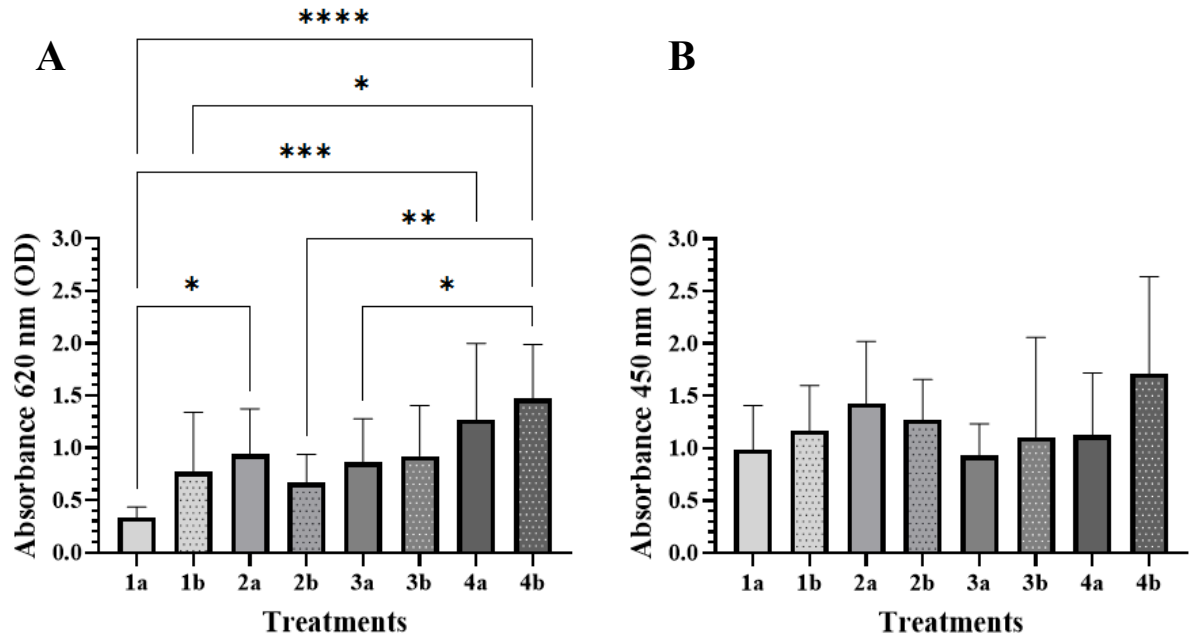


Fig 1. Absorbance results for different treatments of seeds samples in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. *, **, ***, **** mean, respectively, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$. Treatments: 1, 2, 3 and 4 means, respectively, 50, 100, 150 and 200 μL of sample aliquots; a and b means 50 and 100 μL of conjugate.

A detecção de Vip3a por método direto utilizando amostras de parte aérea de plântulas foi ineficaz. Os resultados das médias de absorbância a 620 nm foram bastante inferiores quando comparados a 450 nm, como mostrado na Fig. 2. Neste comprimento de onda, a placa demonstrou picos muito altos de absorbância. O apêndice II também apresenta uma compilação destes dados.

Um dos fatores que provavelmente tenha influenciado nesta divergência é a presença de pigmentos como clorofila e antocianina. A antocianina como composto fenólico pode interferir nos resultados e até causar reatividade cruzada nos teste ELISA¹³, principalmente em um teste de ELISA direto aonde este componente poderia ficar adsorvido nos poços.

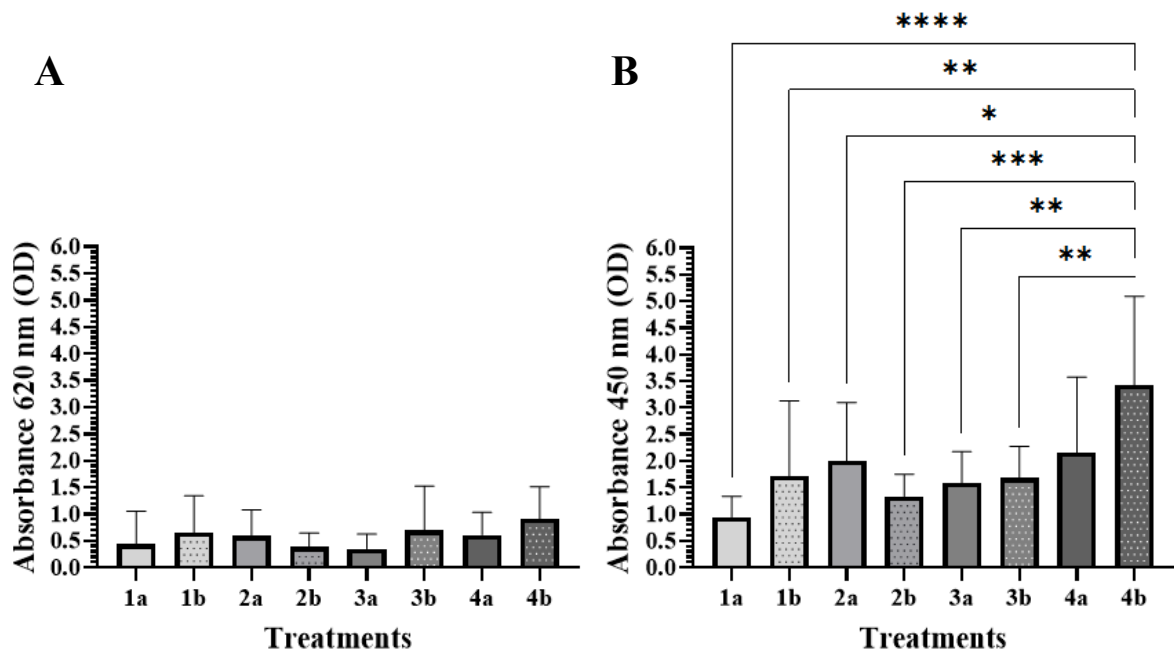


Fig 2. Absorbance results for different treatments of plantlets shoots samples in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. *, **, ***, **** mean, respectively, $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$. Treatments: 1, 2, 3 and 4 means, respectively, 50, 100, 150 and 200 μL of sample aliquots; a and b means 50 and 100 μL of conjugate.

Os resultados das amostras de raízes também não apresentaram diferenças a 620 nm (Fig 3A), mas a 450 nm (Fig. 3B) a média de absorbância dos poços com 200 μL de amostra e 100 μL de conjugado foi estatisticamente diferente quando compara às médias com 100 μL de amostra e a média de 150 μL de amostra e 50 μL de conjugado.

Os dados obtidos das leituras a 450 nm, de maneira geral, apresentaram menor desvio padrão quando comparados aos resultados a 620 nm, também retratado no apêndice III, contudo, em ambos os casos e para todos os tipos de tecidos, houve muita variância residual.

De qualquer forma, a ocorrência de sinais baixos de absorbância e algumas variações já eram esperados, uma vez que, o ELISA direto é uma técnica menos sensível que as demais.¹⁴ O método depende da ligação do antígeno presente na amostra ao material de fase sólida que compõe a placa. Utilizando um extrato bruto de proteínas de amostras de sementes e plantas, o antígeno Vip3a teve que competir com demais proteínas e compostos presentes nas amostras.

Além disso, existem indícios de que pode ter ocorrido contaminação das placas de ELISA entre o bloqueio e a revelação da placa.

Os resultados obtidos neste experimento não são suficientes para estabelecer um protocolo de ELISA direto para detecção de Vip3a em amostras de milho, necessitando de que o mesmo seja refeito a fim de garantir que o protocolo é eficaz ou não para a detecção do antígeno Vip3a.

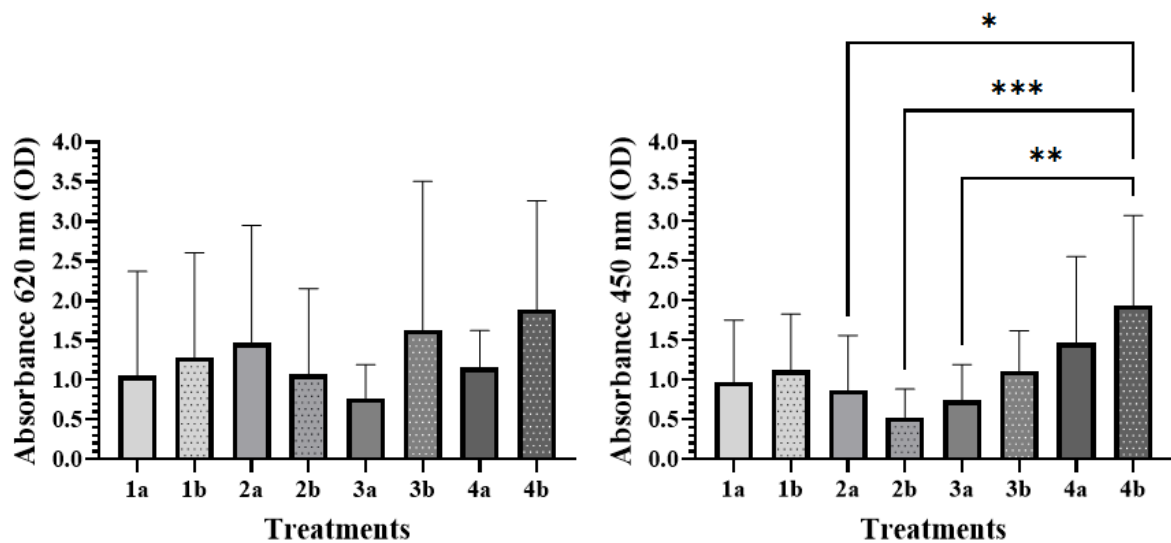


Fig 3. Absorbance results for different treatments of plantlets roots samples in wave-length readings at (A) 620 nm and (B) 450 nm. *, **, *** mean, respectively, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$. Treatments: 1, 2, 3 and 4 means, respectively, 50, 100, 150 and 200 μL of sample aliquots; a and b means 50 and 100 μL of conjugate.

Referências

1. L. R. Barbieri and E. R. T. Stumpf. “*Origem e evolução de plantas cultivadas.*”, **2008**, Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, Embrapa Clima Temperado, Pelotas.
2. A. Borém and G.V. MIRANDA. “*Melhoramento de plantas*”, **2013**, 6 ed., Editora UFV, Viçosa.
3. H. Uchimiya, T. Handa, and D. S. Brar. *Journal of biotechnology*, 1989, 12.1, 1-19.
4. L. Y. Low, S. K. Yang, D. X. A. Kok, J. Ong-Abdullah, N. P. Tan, and K. S. Lai. “*Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method.*”, **2018**, *New visions in plant science*. Intech Open, London, 41-61.

5. P. Yadava, A. Abhishek, R. Singh, I. Singh, T. Kaul, A. Pattanayak, and P. K. Agrawal. *Frontiers in Plant Science*, **2017**, 7, 1949.
6. M. P. Scott and L. M. Pollak, L. M. *Starch-Stärke*, **2005**, 57.5, 187-195.
7. D. N. Duvick. *Advances in agronomy*, **2005**, 86, 83-145.
8. G. P. Dively, P.D. Venugopal, and C. Finkenbinder. *PloS one*, **2016**, 11.12, e0169115.
9. C. S. Figueiredo, A. R. N. Lemes, I. Sebastião, and J. A. Desidério. *Applied biochemistry and biotechnology*, **2019**, 188(3), 798-809.
10. J. J. Estruch, G. W. Warren, M. A. Mullins, G. J. Nye, J. A. Craig, and M. G. Koziel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1996**, 93(11), 5389-5394.
11. F.R. Conceição, Â. N. Moreira, and P. C. Binsfeld, P. C. *Ciência Rural*, **2006**, 36(1), 315-324.
12. J. R. Crowther “ELISA: theory and practice.” **1995**, Vol. 42. *Springer Science & Business Media*.
13. A. L. Robinson, H. J. Lee, and D. Ryu. *Food chemistry*, **2017**, 214, 47-52.
14. K. Shah and P. Maghsoudlou. *British journal of hospital medicine*, **2016**, 77.7, 98-101.

5 CONCLUSÃO

Pôde-se observar que o teste de ELISA sanduíche para detecção de Cry2a se mostrou sensível mesmo variando os volumes da amostra e a concentração dos anticorpos de captura, porém a sensibilidade foi afetada de acordo com a concentração do anticorpo de detecção. Utilizando 100 µl de conjugado a 0,54 µg / ml e 1,08 µg / ml, foram obtidos resultados satisfatórios na detecção de Cry2a.

Além disso, quando a placa foi lida a 450 nm, após a interrupção da reação enzima-substrato, os valores de absorbância foram maiores e menos variáveis do que quando lidos a 620 nm. Exceto quando a intenção do experimento é fazer várias leituras ao longo do tempo e acompanhar a reação, usar uma solução ácida que interrompa a reação pode ser essencial para obter dados mais precisos.

Os resultados obtidos testando amostras de sementes e plântulas de milho não foram conclusivos para estabelecer um protocolo seguro e eficaz de ELISA direto para detecção de Vip3a. Houve muitas variações de sinal com efeitos aleatórios que afetaram diretamente a análise, incluindo a possibilidade de contaminação do teste.

A amostra de sementes obteve resultados mais lineares quanto ao sinal de absorbância e o volume de alíquota aplicada.

Portanto, o protocolo do teste ELISA utilizando anticorpos policlonais anti-Cry2a mostrou-se específico e sensível para analisar a expressão de Cry2a em sementes de milho. Porém, para Vip3a, testes posteriores e ajustes precisam ser feitos a fim de verificar a possibilidade de utilização do método direto para amostras de milho.

Ainda, deve ser considerada também a hipótese de utilização de ELISA sanduíche para analisar a expressão de Vip3a em amostras de milho, sendo este, um ensaio mais sensível.

REFERÊNCIAS

- ASCOLI, C. A.; AGGELER, B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. **BioTechniques**, v. 65, n. 3, p. 127-136, 2018. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 6 ed. Viçosa: Editora UFV, 2013.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
- BRIEFS, ISAAA. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. 2017.
- CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detection and quantification of genetically modified organisms in food and food ingredients. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 315-324, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000100053>
- CROWTHER, John R. Basic immunology. In: **ELISA**. Humana Press, 1995. p. 1-34.
- CRUZ, J.C. et al. Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Área de Informação da Sede-Col Criar Plantar ABC 500P/500R Saber (INFOTECA-E), 2011.
- DATTA, S. K. Impact of plant biotechnology in agriculture. In: **Transgenic Crops IV**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007. p. 3-31. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36752-9_1
- DHAMAD, Ahmed E.; RHIDA, Muna A. Abdal. COVID-19: molecular and serological detection methods. **PeerJ**, v. 8, p. e10180, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>
- DUVICK, D.N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.). **Advances in agronomy**, v. 86, p. 83-145, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)86002-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86002-X)
- ESTRUCH, Juan J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5389>

- FLETCHER, Stephen J. qPCR for quantification of transgene expression and determination of transgene copy number. In: **Crop Breeding**. Humana Press, New York, NY, 2014. p. 213-237. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0446-4_17
- GARG, Monika et al. Biofortified crops generated by breeding, agronomy, and transgenic approaches are improving lives of millions of people around the world. **Frontiers in Nutrition**, v. 5, p. 12, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00012>
- GUIMARÃES, C.T. et al. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009.
- HALFORD, Nigel G.; SHEWRY, Peter R. Genetically modified crops: methodology, benefits, regulation and public concerns. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 62-73, 2000. <https://doi.org/10.1258/0007142001902978>
- KONSTANTINOU, George N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: **Food Allergens**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 79-94. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6925-8_7
- JAMES, Clive. Global status of commercialized transgenic crops: 2002. **ISAAA briefs**, v. 27, p. 1-24, 2002.
- LIPMAN, Neil S. et al. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. **ILAR journal**, v. 46, n. 3, p. 258-268, 2005. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.258>
- MAGALHÃES, P.C. et al. **Fisiologia do milho**. CEP, v. 35701, p. 970, 2002.
- MORIKAWA, Wataru et al. Comparison of monoclonal and polyclonal enzyme-linked immunoabsorbent (elisa) assays for serum lp (a) and differences in reactivities to lp (a) phenotypes. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 9, n. 3, p. 173-177, 1995. <https://doi.org/10.1002/jcla.1860090305>
- ONO, E.Y.S.; HIROOKA, E.Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 359-378, 2003. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2003v24n2p359>
- PAES, M.C.D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2006.

PARKER, Michael W.; FEIL, Susanne C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2004.01.009>

ROCHA, Daniele Rachidi da; MARIN, Victor Augustus. Transgênicos-Plantas produtoras de fármacos (PPF). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 3339-3347, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232011000800033>

TORANE, V. P.; SHASTRI, J. S. Comparison of ELISA and rapid screening tests for the diagnosis of HIV, hepatitis B and hepatitis C among healthy blood donors in a tertiary care hospital in Mumbai. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 3, p. 284-285, 2008. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.42071>

TORRES, Antonio Carlos et al. Bioassay for detection of transgenic soybean seeds tolerant to glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1053-1057, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2003000900005>

< <https://cib.org.br/milho-transgenico/> > Acesso em 26/07/2021 às 18:52

<<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4038-clima-afeta-culturas-de-segunda-safra-e-producao-deve-chegar-a-262-13-milhoes-de-toneladas>> Acesso em 26/07/2021 às 19:15

APÊNDICE I

Table 1 Absorbance means and standard deviations of seeds samples analyzed at 620 nm¹ and at 450 nm².

Conjugate Volume (µL)	Sample Volume (µL)			
	50	100	150	200
50	0,335± 0,101 ¹	0,940± 0,433 ¹	0,863± 0,414 ¹	1,268± 0,730 ¹
	0,9878± 0,420 ²	1,425± 0,597 ²	0,928± 0,304 ²	1,127± 0,593 ²
100	0,7698± 0,572 ¹	0,667± 0,271 ¹	0,924± 0,479 ¹	1,475± 0,515 ¹
	1,172± 0,427 ²	1,271± 0,386 ²	1,105± 0,955 ²	1,711± 0,928 ²

APÊNDICE II

Table 2 Absorbance means and standard deviations of plantlets shoots samples analyzed at 620 nm¹ and at 450 nm².

Conjugate Volume (µL)	Sample Volume (µL)			
	50	100	150	200
50	0,4365± 0,6133 ¹	0,5958± 0,4831 ¹	0,35± 0,2756 ¹	0,6127± 0,4194 ¹
	0,9488± 0,39 ²	2,008± 1,09 ²	1,587± 0,5889 ²	2,162± 1,413 ²
100	0,6563± 0,685 ¹	0,38± 0,2689 ¹	0,6996± 0,8278 ¹	0,9173± 0,5936 ¹
	1,721± 1,411 ²	1,337± 0,4139 ²	1,679± 0,5998 ²	3,425± 1,669 ²

APÊNDICE III

Table 3 Absorbance means and standard deviations of plantlets roots samples analyzed at 620 nm¹ and at 450 nm².

Conjugate Volume (µL)	Sample Volume (µL)			
	50	100	150	200
50	1,055± 1,317 ¹	1,466± 1,486 ¹	0,7728± 0,4229 ¹	1,156± 0,4702 ¹
	0,9743± 0,7821 ²	0,8721± 0,691 ²	0,7427± 0,4522 ²	1,469± 1,087 ²
100	1,287± 1,321 ¹	1,074± 1,082 ¹	1,63± 1,879 ¹	1,89± 1,371 ¹
	1,125± 0,7063 ²	0,5273± 0,3578 ²	1,112± 0,5086 ²	1,939± 1,138 ²

ANEXO I

Instructions to Authors

Editorial Policies

Analytical Sciences is an international journal published monthly by The Japan Society for Analytical Chemistry (JSAC). The journal publishes papers from all areas of the analytical sciences; including fundamental and applied analytical chemistry, chemical, physical and biological analyses, and nano- and micro-analytical methodology.

“Original Papers” should be current, and describe the original work in full detail. These papers may contribute to any domain of analytical sciences, including sampling processes, separation and concentration, spectroscopy, electrochemical analysis, imaging, surface and particle analysis, synthesis of analytical reagents, data processing, and theoretical treatments.

“Rapid Communications” are reports revealing new analytical methods or findings in all areas of analytical sciences, which have sufficient significance to warrant prompt publication. If the authors submit for “Rapid Communications”, the reason for rapid publication should be clearly stated, followed by the title page.

“Notes” are short papers, that report novel and valuable information leading to the development of new areas in analytical sciences.

“Advancements in Instrumentation” report in brief on progress in analytical instrumentation.

“Reviews” including “Focus” and “Research Trends” present a general perspective of an outstanding subject area in analytical sciences. Authors intending to offer reviews are advised to first contact the Editor.

Authors should read the “Ethical Guidelines for Authors”, which follows the present instructions. Papers submitted to *Analytical Sciences* are considered with the understanding that they have been neither previously published, nor under consideration elsewhere. Authors are jointly responsible for the content of the publication. Errors in content are considered to be shared equally by all authors. The decision regarding the acceptance or rejection of a paper is at the sole discretion of the Editor.

Submission of Manuscripts

- (1) All manuscripts must be submitted electronically *via* the JSAC online submission website (<http://db.jsac.or.jp/submitmanuscripts>). No e-mail or hard-copy submissions will be

accepted. Authors must submit the following materials as separate files: manuscript (as a single PDF file including text, figures, and tables) and Supporting Information for Publication and/or for Review Only, if needed. After completing the online submission procedure, an acknowledgement will be made automatically to the author *via* e-mail. Then, an official acknowledgement will be made by the editorial office along with a paper reference number. In the case that the author does not receive it or any correspondence within 10 days, please contact the editorial office *via* e-mail (analytsci@jsac.or.jp).

- (2) Submission of a manuscript is free of charge.
- (3) The length of the manuscript is dependent upon the category. “Original Papers” should be 6 printed pages or less. “Rapid Communications” and “Notes” should be 3 printed pages or less. For “Reviews” and “Advancements in Instrumentation”, the maximum length of the manuscript is restricted to be 10 and 4 printed pages, respectively. Before a manuscript is submitted, the authors should estimate the number of printed pages using an Excel sheet, which can be downloaded from *Analytical Sciences*’ website (<http://www.jsac.or.jp/analytsci/>).
- (4) Authors must identify persons who are qualified to serve as reviewers. Such reviewers may be used at the discretion of the Associate Editors.
- (5) When a revised manuscript is submitted, it should be sent along with a summary of the changes made and a response to the reviewers. The re-submission should be done within 30 days for major revision and within 20 days for minor revision after receiving the reviewers’ report.
- (6) All submitted manuscripts are screened by CrossCheck™.

Preparation of Manuscripts

- (1) The manuscript materials (title, abstract, text, references, tables, figures, captions, and Graphical Index) must be written in English, double-spaced, on A4 or 8 1/2 × 11 page size with ample margins. All of the pages should be consecutively numbered starting with the title page. The recommended fonts used are Times or Times New Roman and Symbol, and the font size should be 11 point. Do not use non-English fonts, otherwise the PDF files can not be reproduced perfectly. For the authors’ convenience, a template can be downloaded from *Analytical Sciences*’ website.
- (2) The title page should contain the title of the article, the names, affiliations, and addresses of all the authors. The title should be informative enough to make the content readily understandable. Avoid unnecessary use of vague expression, such as “novel” and “new”. Also avoid use of abbreviations of analytical chemistry methods and chemicals, although

some common abbreviations, such as ICP, AAS, HPLC, GC, IR, NMR, MS and FIA, may be allowed at the discretion of the Editor.

- (3) The abstract should be self-contained, describing what was done and concluded. The length should be less than 150 words for “Original Papers” and “Reviews”, and 80 words for “Rapid Communications”, “Notes”, and “Advancements in Instrumentation”. Additionally, a list of keywords should be provided (not more than 10 words).
- (4) The text should be divided into major headings, such as Introduction, Experimental, Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgements, and References. Major sections may be divided into subheadings to make easier reading. These subheadings should be typed in italics. “Rapid Communications” do not require any headings.
- (5) The SI system of units should be used.
- (6) References must be numbered consecutively in the order that they are cited in the text and designated by a superscript. A list should be included on separate double-spaced pages at the end of the text. For the proper abbreviations of the journal titles, refer to “Chemical Abstracts”. Examples are shown below. Journals

1. M. Harada, M. Shibata, T. Kitamori, and T. Sawada, *Anal. Sci.*, **1999**, *15*, 647.
2. G. J. Moody, G. S. Sanghera, and J. D. R. Thomas, *Analyst* [London], **1988**, *113*, 1419.
3. Y. Yoshikawa, P. S. Dahr, and H. Yamatera, *Chem. Lett.*, **1984**, 841.
4. H. Nakamura and Z. Tamura, *Bunseki Kagaku*, **1988**, *37*, 35.
5. T. Buehrer, P. Gehrig, and W. Simon, *Anal. Sci.*, in press. Books
6. A. J. Bard and L. R. Faulkner, “*Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*”, **1980**, John Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
7. R. S. Houk, H. J. Svec, and V. A. Fassel, “*Dynamic Mass Spectrometry*”, ed. D. Price and J. F. J. Todd, **1981**, Vol. 6, Chap. 19, Heyden, London, 234.
8. S. Tunogai and S. Noriki, “*Kaiyou Kagaku (Oceanic Chemistry, in Japanese)*”, ed. M. Nishimura, **1983**, Sangyoutosho, Tokyo, 55.
9. O. W. Griffith, in “*Methods of Enzymic Analysis*”, ed. H. U. Bergmeyer, 3rd ed., **1985**, VCH, Weinheim, 521.

Materials presented at meetings (Proceedings and Abstracts)

10. G. Kolbl, M. Krachler, K. Kalcher, and K. J. Irgolic, in Proceedings of the Fifth International Symposium on Use of Selenium and Tellurium, ed. S. C. Carapella, J. E. Oldfield, and Y. Palmieri, **1994**, STDA, Grimbergen, Belgium, 291.

Reports

11. T. V. Raglione and R. A. Hartwick, Abstracts of Papers, Pittsburgh Conference and Exposition on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, New Orleans, LA, **1988**, Abstract 773.
12. JIS K 0119, “*General Rules for X-ray Fluorescence Spectrometric Analysis*”, **1987**, Japanese Industrial Standards Committee, Tokyo.

Patents

13. G. E. Erlemann and H. Ippen, Swiss Patent Application, **1968**, 18964.
14. H. F. Lockwood, U. S. Patent, **1965**, 3759835; [Chem. Abstr., **1970**, 73, 46241q].
15. E. L. Dorr, U. S. Patent, **1960**, 2921952; [*Angew. Chem.*, **1967**, 79, 520].

Websites

16. Database of Natural Matrix Reference Materials, Compilation prepared by International Atomic Energy Agency (IAEA), <http://www.iaea.org/programmes/nahunet/e4/nmrm/browse.htm>. Personal communications should be avoided, but if necessary, they may be referred.
 17. Private communication, S. Fujiwara (Kanagawa University), Dec. 20, 1988.
- (7) Tables should be prepared separately. The title of a table should be placed at the top. Lengthy tables should be avoided. Number the tables consecutively with Arabic numerals in the order in which they appear in the text.
 - (8) Figures should be prepared with large lettering and heavy lines that will be legible when printed. Their height must not exceed 25 cm. Only one figure should be drawn on a page. The printed quality of the figures submitted should be high enough to be suitable for digital scanning. Figures should be numbered in the order in which they appear in the text. Their captions must be listed on separate pages. Color prints will be accepted, but are at the authors' expense.
 - (9) In figures and tables, the letter “/” should be used as a separator between the label and unit (e.g. Concentration/mol dm⁻³). The fraction indicator, such as % and ppm, should be preceded with “,” (e.g. Yield, %).
 - (10) A simple and informative figure in color should be prepared for a Graphical Index (GI). This figure should be entirely original. Adjust its size for GI to be 5 cm long and 8 cm wide. After the manuscript is accepted, the authors will be requested to submit a final manuscript along

with the GI file. The figure must be saved in the JPEG, PNG or TIFF format at 300 dpi. To prepare the GI, see the journal website (<http://www.jsac.or.jp/analsci/>).

Supporting Information

Extensive tables, figures, and other materials (including high-resolution color photographs, crystallographic data, *etc.*) may be included in the Web edition as “Supporting Information (SI) for Publication”. SI for Publication will not be part of the printed article, but can be accessed separately on the Web by readers. At the time the manuscript is first submitted, the authors should provide SI for Publication as a single PDF file that is separate from the primary manuscript. The file size should not exceed 5 MB. A statement of the availability of SI for Publication should appear in the text before the references section as

Supporting Information: (Describe concisely what is in the material). This material is available free of charge on the Web at <http://www.jsac.or.jp/analsci/>.

Figures, tables, equations, *etc.* provided in SI should be labeled as Fig. S1, Table S2, Eq. (S3), *etc.*, and should be cited in the text as “Fig. S1 (Supporting Information)” or “Tables S2 – S4 (Supporting Information)”.

Authors are required to submit any materials that are needed for review, *e.g.*, papers relevant to the manuscript that are in press or have been submitted, as “SI for Review Only”. SI for Review Only should also be prepared using the PDF format and the number and the total size of the files should not exceed three and 15 MB, respectively.

Accepted Manuscripts

An accepted manuscript is one that has been peer-reviewed and accepted for publication. Before undergoing English proofreading, technical editing, formatting for publication and author proofing, it may be published as an “Advance Online Publication” at the journal’s Web site prior to release of the journal issue. In the meantime, after revising the manuscript according to any and all editorial suggestions, the authors will be requested to submit a final manuscript along with the Graphical Index (GI) file. The figure for the GI should be prepared to be 5 cm long and 8 cm wide and saved in the JPEG, PNG or TIFF format at 300 dpi.

When a galley proof is sent, the authors should check and send it back within 48 hours by e-mail or FAX. Otherwise, the manuscripts can only be published by permission of the Editor. **Copyright**

The Japan Society for Analytical Chemistry (JSAC) holds the copyright to all contents published in *Analytical Sciences*. A copyright transfer form is sent with the galley proof and is required for publication. This form should be returned to JSAC with the galley proof.

Republication or reproduction of any material appearing in *Analytical Sciences* is permitted under license from JSAC.

Reprints

The authors will receive an order form for reprints along with a copyright transfer form. Orders of reprints are limited to sets of 50 reprints. Reprint order from authors would be GREATLY appreciated!

Corrections

Corrections to a paper published within 6 months are to be sent to the Editor, and they will be published in an Errata section after permission by the Editorial Committee.

Subscription

The annual rate for overseas subscription is US\$130 for personal use and US\$260 per institution. Both include surface mail postage. Airmail postage is at US\$70 extra per volume.

Ethical Guidelines for Authors

Duplicate Publication

It is unethical for authors to submit multiple similar manuscripts for publication at a time. It is also unethical for authors to submit a manuscript that has already been published or is in the process of review elsewhere. Excessive fragmentation of the authors' work into multiple manuscripts is not accepted. Submission of a full paper following the author's preliminary work is permitted only when such publication is properly informed to the Journal Editor at a stage of submission.

Reproducibility, Plagiarism and Falsification Authors must report their work accurately and precisely in order to be reproduced by other researchers independently. Plagiarism and falsification in any parts of the submitted paper are serious offences to the scientific community and must be strictly avoided. Authors are also requested to provide proper references associated with their work, including the authors' relevant previous work published elsewhere.

Authorship

The co-authors should be limited to those who have sufficiently contributed to the content of the work in responsible and accountable manners. The corresponding author must confirm that submission of the manuscript has been approved by all co- authors. The author's name will appear in the paper as is written in the submitted manuscript. No changes in the list

of the authors are acceptable in the processes of revision and proofreading without permission by the Journal Editor.

Conflict of Interest

Authors must disclose conflicts of interest and state all funding sources that have supported the work.

Human and Animal Subjects

In the experimental section, authors must briefly state that any study involving human and animal subjects has been conducted in accordance with the relevant laws and the rules approved by the institutional committee. For a study related to human subjects, authors must clearly describe informed consent that has been obtained for all subjects.

Safety

Authors are strongly requested to give information in the manuscript on chemicals and procedures that could raise safety problems upon their usage.