

郭鹏燕, 徐振林, 陈子键, 等. 抗杀螟硫磷纳米抗体表达、纯化策略研究及检测方法建立 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(23): 298–305. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030328

GUO Pengyan, XU Zhenlin, CHEN Zijian, et al. Expression, Purification Strategy and Detection Method Establishment of Anti-Fenitrothion Nanobody[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(23): 298–305. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030328

· 分析检测 ·

抗杀螟硫磷纳米抗体表达、纯化策略研究及检测方法建立

郭鹏燕¹, 徐振林¹, 陈子键^{2,*}, 沈兴^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2. 肇庆学院食品与制药工程学院, 广东肇庆 526061)

摘要: 为了高效制备高纯度的抗杀螟硫磷纳米抗体, 本研究对一株低表达水平的重组抗杀螟硫磷纳米抗体在大肠杆菌中的表达条件进行优化, 以 IPTG 浓度、温度为自变量, Nb 表达量为因变量进行单因素实验, 同时对抗体纯化方法进行研究。结果表明, 在 37 °C、无 IPTG 条件下抗杀螟硫磷纳米抗体表达量最高, 达到 6 mg/L, 并且发现 IPTG 用量与诱导温度存在交互效应, 通过 Ni 亲和层析与凝胶过滤层析两步纯化法, 最终得到了纯度 98% 以上的抗杀螟硫磷抗体, 表明该表达与纯化策略可以高效制备抗杀螟硫磷纳米抗体。利用所获得的纳米抗体, 建立了 ic-ELISA 检测方法, 其 IC₅₀ 为 5.81 ng/mL, 检出限为 0.25 ng/mL, 检测范围为 0.78~43.07 ng/mL。选择生菜和白菜为样品进行添加回收实验, 添加回收率在 93.3%~111.7% 之间, 变异系数 (CV) 值在 2.3%~18.2% 之间。基于杀螟硫磷纳米抗体所建立的方法灵敏度高, 能够满足国标规定的杀螟硫磷监测需求, 可用于杀螟硫磷的快速筛查。本研究为开发高效快速的杀螟硫磷免疫检测方法奠定了基础。

关键词: 杀螟硫磷, 纳米抗体, 诱导表达, 纯化策略, 活性鉴定

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)23-0298-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030328



本文网刊:

Expression, Purification Strategy and Detection Method Establishment of Anti-Fenitrothion Nanobody

GUO Pengyan¹, XU Zhenlin¹, CHEN Zijian^{2,*}, SHEN Xing^{1,*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. School of Food Pharmaceutical Engineering, Zhaoqing University, Zhaoqing 526061, China)

Abstract: For the purpose of preparing anti-fenitrothion nanobodies with high-purity efficiently, the expression conditions of a recombinant anti-fenitrothion nanobody with low expression level in *E. coli* was optimized. The IPTG concentration and inducing temperature were selected as the independent variables and the nanobody expression level was used as the dependent variable for single-factor experiments, and the purification strategy was also investigated. The results showed that the highest expression level of 6 mg/L anti-fenitrothion nanobody was achieved at 37 °C without IPTG. Moreover, an interactive effect of IPTG dosage and inducing temperature was found. After a two-step purification of Ni affinity chromatography and gel filtration chromatography, the anti-fenitrothion nanobodies was finally yielded with more than 98% purity, indicating that the expression and purification strategies in this study can obtain anti-fenitrothion nanobodies efficiently. An ic-ELISA assay was then established based on the obtained nanobody, with an IC₅₀ of 5.81 ng/mL and an LOD of 0.25 ng/mL, and a detection range of 0.78~43.07 ng/mL. The assay was applied to determine fenitrothion in

收稿日期: 2023-03-29

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A15110513)。

作者简介: 郭鹏燕 (1998-), 女, 硕士, 研究方向: 纳米抗体稳定性结构基础研究, E-mail: gpy18211636715@163.com。

* 通信作者: 陈子键 (1991-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: chenzijian@zqu.edu.cn。

沈兴 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: shenxing325@163.com。

Chinese cabbage and lettuce samples. The recovery rate of addition was between 93.3%~111.7%, and the coefficient of variation (CV) was between 2.3%~18.2%. The proposed assay based on anti-fenitrothion nanobody has high sensitivity, which can meet the requirements for monitoring of fenitrothion under the national standard, thus can be used for rapid screening of fenitrothion. This study laid a foundation for the development of efficient and rapid immunoassays for fenitrothion.

Key words: fenitrothion; nanobody; induced expression; purification strategy; activity identification

我国作为传统农业大国,农业生产规模巨大,农药滥用及不合理施用的现象也比比皆是^[1]。农药在水、土壤以及农作物中的残留严重威胁了人类的生命健康^[2-3]。杀螟硫磷作为一种广谱的有机磷类杀虫剂,因其高效的杀虫性能和低廉的价格被广泛地应用于蔬菜、水果、谷物等农产品的虫害防治^[4-5],其不合理施用导致的农药残留严重威胁人类的生命健康安全。我国食品安全国家标准 GB2763-2021 对杀螟硫磷在谷物、油类、蔬菜、水果和肉类等食品中的最大残留限量(MRLs)作出了规定,以蔬菜水果为例,最大残留限量均不超过 0.5 mg/kg。近年来在各地农产品农药残留监测中,仍常有杀螟硫磷残留检出的报导,例如 2017 年一项针对泉州地区蔬菜中有机磷农药残留的监测显示,几种残留超标的化合物杀螟硫磷、甲拌磷、丙溴磷和水胺硫磷的气相检测值分别为 5.85、0.04、1.28、0.062 mg/kg,远远高于国标规定的蔬菜中最大残留限量,其中杀螟硫磷超标最为严重^[6]。因此,应对杀螟硫磷残留进行监测,找到有效保障人民健康安全,高效、经济、实用的检测方法。

目前,我国食品安全国家标准检测方法(GB 23200.113-2018)规定的杀螟硫磷残留的检测方法是气相色谱-质谱联用仪器分析法^[7],但是其需要繁琐的前处理、仪器操作相对复杂,对相关操作人员要求较高,不能满足现场大规模快速检测^[8]。免疫分析方法由于其灵敏度高、特异性好、方便快捷、易操作等优点,被广泛应用于农药、兽药残留等食品安全监测^[9-10]。近几年报道了很多食品中杀螟硫磷残留的免疫分析方法,其中应用较多的是单克隆抗体和多克隆抗体^[11-14],但存在生产周期长、成本高、免疫效果不稳定、重复性较差等问题^[15]。与传统抗体相比,基因工程抗体具有制作成本较低、制备周期短、抗体较稳定具有更好的实验重现性,并且可以通过基因工程的手段对抗体进行改造等诸多优势^[16-17]。纳米抗体(Nbs)本质上属于基因工程抗体的一种,相较于传统抗体衍生来的 Fab、scFv 等基因工程抗体,Nbs 分子极小、结构紧致,具有溶解度好、稳定性和亲和力高的优势^[18-20],因而从被发现以来迅速地被应用于生物制药、医疗诊断和食品安全监测等领域,应用前景十分广阔。

目前常用的纳米抗体体外表达体系主要是大肠杆菌和酵母细胞,其中大肠杆菌是最早用于外源基因表达的宿主细胞,也是目前重组蛋白制备最常用的表达系统,有成熟的操作方法以及各类商业化表达载体

和宿主^[21],具有表达水平高,操作简单,培养成本低、周期短等优势^[22]。Nbs 可以在细胞质表达或者通过信号肽介导到周质腔表达,后者处于氧化环境,有利于二硫键形成,促进 Nbs 正确折叠表达,产生可溶性蛋白^[23-24]。但是 Nbs 在周质腔中的表达水平较低,往往难以富集,因此需要通过适宜的表达与纯化策略以达到高效获取 Nbs 的目的。除了本实验室的前期研究之外,目前尚未见其他关于抗杀螟硫磷纳米抗体的报道,而本实验室前期构建的异源表达体系表达水平和纯度较低,抗体富集较为困难,无明确的表达及纯化策略用于制备高纯度的抗杀螟硫磷纳米抗体,制约了其在杀螟硫磷监测中的应用^[25-26]。本研究在前期构建的一株低表达水平的抗杀螟硫磷纳米抗体工程菌基础上,通过对其表达条件进行优化以及对纯化策略进行研究,以期高效制备高纯度的抗杀螟硫磷纳米抗体,并验证其检测性能,为纳米抗体的制备与相关免疫检测方法的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

PINQ-VHH(sm6)质粒、杀螟硫磷检测抗原 实验室前期制备;质粒小提试剂盒 北京天根生化科技有限公司;表达菌株 BL21(DE3)感受态 北京全式金生物技术股份有限公司;酵母提取物、胰蛋白酶 美国 Thermo 公司;琼脂糖 广州 BioFroxx 公司;卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG) 广州华奇盛生物公司;Tris、咪唑、甘氨酸、SDS 广州 BioFroxx 公司;PAGE Gel Fast Preparation Kit 上海雅酶生物医药科技有限公司;Ni Sepharose™ 6 Fast Flow、HiLoad Superdex 75 pg 16/600 层析柱 美国 GE Healthcare 公司;DTT 上海阿拉丁生化科技股份有限公司;Protein Marker、DNA Marker 美国 Thermo 公司;ultra GelRed(10000 \times) 南京 Vazyme 公司;MonoRab™ Rabbit anti-Camelid VHH(HRP) 南京金斯瑞科技有限公司;杀螟硫磷标准品 坛墨质检科技股份有限公司;白菜、生菜样品 购自华南农业大学三角市市场;其他化学试剂均为分析纯。

PowerPac™ 通用电泳仪 美国 Bio-Rad 公司;AKTA pure 蛋白质层析系统 美国 GE Healthcare 公司;SW-CJ-IF 型净化工作台 苏州净化设备厂;HZQ-X100 恒温振荡培养箱 培英实验设备有限公司;-80℃ 超低温冰箱 Panasonic;LRH-150A 型生化培养箱 广东省医疗器械厂;高压灭菌锅 日本 Hirayama 公司;Universal Hood II 多功能凝胶成像

仪 美国 Bio-Rad 公司; Nanodrop 2000c 微量分光光度仪 美国 Thermo 公司; Sorvall Lynx 4000 超高速冷冻离心机 美国 Thermo 公司; Multiskan MK3 酶标仪 美国 Thermo 公司; Wellwash MK2 洗板机 上海艾研生物科技有限公司; HH W21-600 电热恒温水箱 上海悦丰仪器仪表有限公司; SKFG-01 电热恒温鼓风干燥箱 黄石市恒丰医疗器械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 PINQ-VHH-sm6 质粒提取与转化 实验室前期制备的含有 sm6 重组质粒的冻存甘油菌^[27], 接种到 10 mL Kana 抗性 LB 液体培养基中活化, 用质粒小提试剂盒进行质粒提取, 提取完成后用核酸电泳进行验证。将 1~2 μL 重组质粒加入到感受态中, 轻弹混匀后置于冰水浴 30 min, 接着于 42 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅热击 90 s, 立即冰水浴 2 min, 取出后加入 600~800 μL LB 液体培养基, 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h。培养后的菌液 12000 r/min 离心 2 min 弃去大部分上清, 留 150 μL 进行菌体重悬, 涂布于 LB-Kana 平板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 12~16 h, 待长出单一菌落。

1.2.2 抗杀螟硫磷纳米抗体表达条件优化 从转化后的平板上挑取单菌落到 10 mL LB-Kana 液体培养基中, 200 r/min、37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。取活化的菌液以 1:100 的比例加入到 2 \times YT-Kana 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 振荡培养到对数期, 将菌液以每管 10 mL 分装到 50 mL 离心管中进行诱导表达。诱导温度分别选择 37、28、16 $^{\circ}\text{C}$, 诱导剂 IPTG 用量分别采用 1、0.7、0.5、0.3、0.1 mmol/L^[28], 于 250 r/min 振荡诱导表达 16 h, 以探索不同温度与诱导剂用量下的目的蛋白表达情况。将培养好的菌液在 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 5 min 收集菌体, 弃去上清。采用蔗糖渗透压法提取周质蛋白^[29], 每管收集菌体中加入 70 μL 5 \times TES, 重悬菌体, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 3 h, 取出后加入 210 μL 1 \times TES, 室温解冻重悬菌体, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 1 h 后, 于 12000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 25 min, 收集上清, 即为周质蛋白。将不同表达条件下的周质蛋白跑 SDS-PAGE 电泳验证表达情况。

1.2.3 抗杀螟硫磷纳米抗体纯化

1.2.3.1 亲和层析纯化 采用 Ni Sepharose HP 5 mL 亲和柱对上一步提取的周质蛋白进行第一步亲和纯化, 首先使用结合缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl, pH7.4) 进行上样, 继续冲洗 5 个柱体积后, 逐渐提高洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、300 mmol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑, pH7.4) 的浓度进行梯度洗脱, 在 50 min 内洗脱缓冲液的比例从 0% 增加到 100%, 对洗脱峰进行收集并用 Nanodrop 测定蛋白浓度, 跑 SDS-PAGE 电泳对纯化

效果进行验证。此外, 为了提升亲和层析的纯化效果, 同时采用在结合缓冲液和洗脱缓冲液中加入 1 mmol/L DTT 的策略, 探索对纯化效果的影响。

1.2.3.2 凝胶过滤层析法 采用 Superdex 75pg 凝胶柱进行第二步纯化。将上一步纯化得到的蛋白溶液用 3000 Da 的超滤管反复离心浓缩到 5 mL, 用 1.2 个柱体积的平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl, pH7.4) 平衡柱子后进行上样, 继续冲洗 1 个柱体积, 不同分子量大小的蛋白在不同时间被洗脱下来, 收集全部的洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳验证, 用 Nanodrop 测定目的蛋白浓度。

1.2.4 间接 ELISA 检测方法建立 利用纯化得到的抗杀螟硫磷纳米抗体建立间接 ELISA 方法 (indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA), 对纳米抗体的检测性能进行评价, 建立标准曲线, 具体操作步骤如下: 用包被液将杀螟硫磷检测抗原稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入到 96 孔酶标板中, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中孵育 12 h, 用 PBST 洗板后用封闭液封闭 3 h。在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被原条件下, 测定波长 450 nm 处的吸光值在 0.8~1.5 之间的抗体浓度作为工作浓度。将 50 μL 抗体工作溶液与 50 μL 不同浓度杀螟硫磷标准溶液在微孔中混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min 后洗板 5 次。按照 1:5000 的比例用 PBST 稀释 anti-VHH HRP 二抗, 每孔加入 100 μL 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后再次洗板 5 次。每孔加入 100 μL 显色液 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 用 10% H_2SO_4 终止反应。用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光值, 以 B/B_0 值为纵坐标, 以杀螟硫磷药物浓度为横坐标, 其中 B 为相应浓度稀释的吸收值, B_0 为空白孔的吸收值, 拟合函数的方程为:

$$y = \frac{(A-D)}{[1+(x/C)B]} + D$$

式中, A 是药物浓度最低时对应的吸收值; D 是药物浓度最高时对应的吸收值; C 是中点浓度, 当药物浓度等于 C 是吸收值为 $(A+D)/2$, 处于曲线的拐点处, 对应浓度即为 IC_{50} ; B 是曲线的陡峭程度, 即斜率因子。

1.2.5 实际样品检测 样品前处理方法参考 GB 23200.113-2018 进行: 白菜和生菜去除根部, 分别打成匀浆, 准确称取匀浆样品 10 g 于 50 mL 离心管, 加入 10 mL 乙腈、4 g 硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠、0.5 g 柠檬酸氢二钠和 1 颗陶瓷搅拌子, 振荡涡旋 1 min, 4200 r/min, 离心 5 min。吸取 6 mL 上清液到 15 mL 离心管中, 加入 885 mg 硫酸镁、150 mg 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶 (PSA) 及 15~45 mg 石墨化炭黑 (GCB), 涡旋混匀 1 min, 4200 r/min 离心 5 min。为了简化前处理步骤, 样品提取液不经过氮吹复溶, 用 PBS 稀释至一定倍数后直接用于 ic-ELISA 检测。

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 软件进行数据统计, 所有数据均为 3 次平行实验测定结果的平均值 \pm 标准差, 并采用 Origin 2018 软件(美国 OriginLab 公司)对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 抗杀螟硫磷纳米抗体诱导表达条件优化

提升纳米抗体体外表达水平的方法有很多, 如对基因编码序列进行密码子优化^[30-31]、与分子伴侣(GroES、GroEL、DnaK 等)、折叠酶(PDI、Dsb 家族等)或可溶性蛋白融合表达^[32-33], 以及更换表达载体或宿主等, 而优化培养条件是一种最为简单且有效的方法, 可以通过低温诱导、调整诱导剂浓度或在培养基中加入营养物质等方式提高重组蛋白可溶性表达水平。

本研究以 37 °C、1 mmol/L IPTG 作为初始表达条件, 首先进行温度优化, 分别在 37、28、16 °C 条件下进行诱导, 同时设置不加 IPTG 的样品作为对照, 提取周质蛋白进行电泳验证, 结果如图 1(a)所示。在 1 mmol/L IPTG 条件下, 目的蛋白表达量随着诱导温度升高而降低, 在 16 °C 下诱导表达提取得到的周质可溶性蛋白量最多。与此同时, 发现没有 IPTG 诱导的对照组也能正常表达, 且表达量较高, 说明该重组质粒存在泄露表达, 因此接着对诱导剂的浓度进行优化。

通过在 16 °C 下对 0~1 mmol/L 浓度范围的 IPTG 用量进行探索, 结果发现诱导剂的用量对于蛋白的表达量影响并不大, 且与无 IPTG 条件下的表达量接近, 因此从节约成本和简化操作的角度考虑, 选择不加诱导剂直接进行表达, 并在此条件下重新确定最优表达温度。结果与预想不同, 如图 1(c)所示, 目的蛋白表达量随温度升高而升高, 在 37 °C 下表达量最高, 与 1 mmol/L IPTG 下的结果正好相反, 说明 Nbsm6 的表达水平随温度的变化趋势与 IPTG 用量密切相关, 不同的 IPTG 含量使得 Nbsm6 的表达水平随温

度变化呈现相反趋势。高 IPTG 条件下, 可溶蛋白含量随温度的升高而降低; 无 IPTG 条件下, 可溶蛋白含量随温度的升高而增加, 同样在实验过程中观察到的菌体含量也呈现出相同的趋势。有研究表明 IPTG 在诱导蛋白表达的同时可能会具有影响表达菌生长的双重作用, 原因在于 IPTG 本身的毒性以及异源基因快速诱导表达消耗了大肠杆菌的营养成分, 造成了大肠杆菌的代谢负担。此外, 重组蛋白活性引起的副反应或其底物、产物和中间体的毒性都会影响菌体生长^[34-35], 因此蛋白的表达量不会随着 IPTG 浓度的增加而无限增加, IPTG 浓度过高反而形成负面影响。除此之外, 本研究发现高温条件下, IPTG 对大肠杆菌的毒性作用更加明显, 其原因可能是高温条件加速了早期重组蛋白表达以及半乳糖苷衍生物的积累, 加大了对宿主的毒性以及胞内营养物质的消耗, 进一步减缓了大肠杆菌生长^[36-37], 最终显著影响了蛋白表达水平; 而在无 IPTG 时, 由于泄露表达可以使重组抗体在较高培养温度下产量更高。

因此, 在对重组蛋白进行表达制备时不能忽略 IPTG 对大肠杆菌的负面作用及其对不同温度的响应情况, 应同时考虑温度和诱导剂浓度的交互效应, 以确定最优表达策略, 不能只是通过单因素实验确定抗体的最佳表达条件, 应该将不同温度和 IPTG 浓度进行交叉研究。另外, 在对抗体的表达条件进行优化时, 不能忽略不同因素对抗体活性的影响, 抗体活性的降低将直接影响其检测效果。本研究中 Nbsm6 的表达最终确定在 37 °C、无 IPTG 条件下进行, 相较于优化前在 37 °C、1 mmol/L IPTG 条件下蛋白表达量 1.565 mg/L, 优化后蛋白表达量为 6 mg/L, 是优化前的 3 倍以上。

2.2 抗体纯化策略优化

将提取的周质蛋白, 采用 Ni 亲和柱层析方法进行第一步纯化, 纯化结果如图 2(a)所示。亲和层析后 18 kDa 左右有明显目的蛋白富集, 但依然存在较多杂蛋白, 可能是在蛋白质浓度过高时发生了聚集^[38],

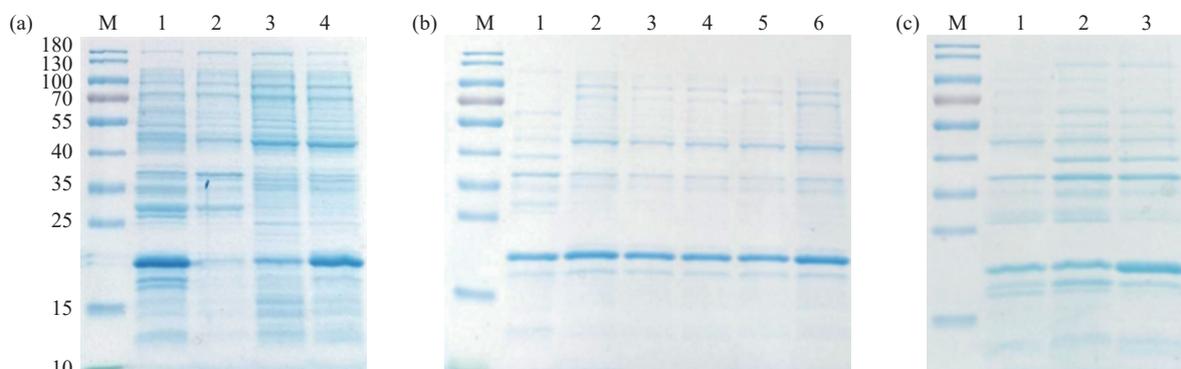


图 1 抗体表达条件优化

Fig.1 Optimization of antibody expression conditions

注: (a) 1 mmol/L IPTG 下诱导温度优化, 1-无 IPTG, 37 °C; 2-4 分别为 1 mmol/L IPTG, 37、28、16 °C; (b) 16 °C 下诱导剂用量优化, 1-6 分别是 0、1、0.7、0.5、0.3、0.1 mmol/L IPTG; (c) 无 IPTG 条件下诱导温度优化, 1-3 分别是 16、28、37 °C; M: 蛋白 Maker。

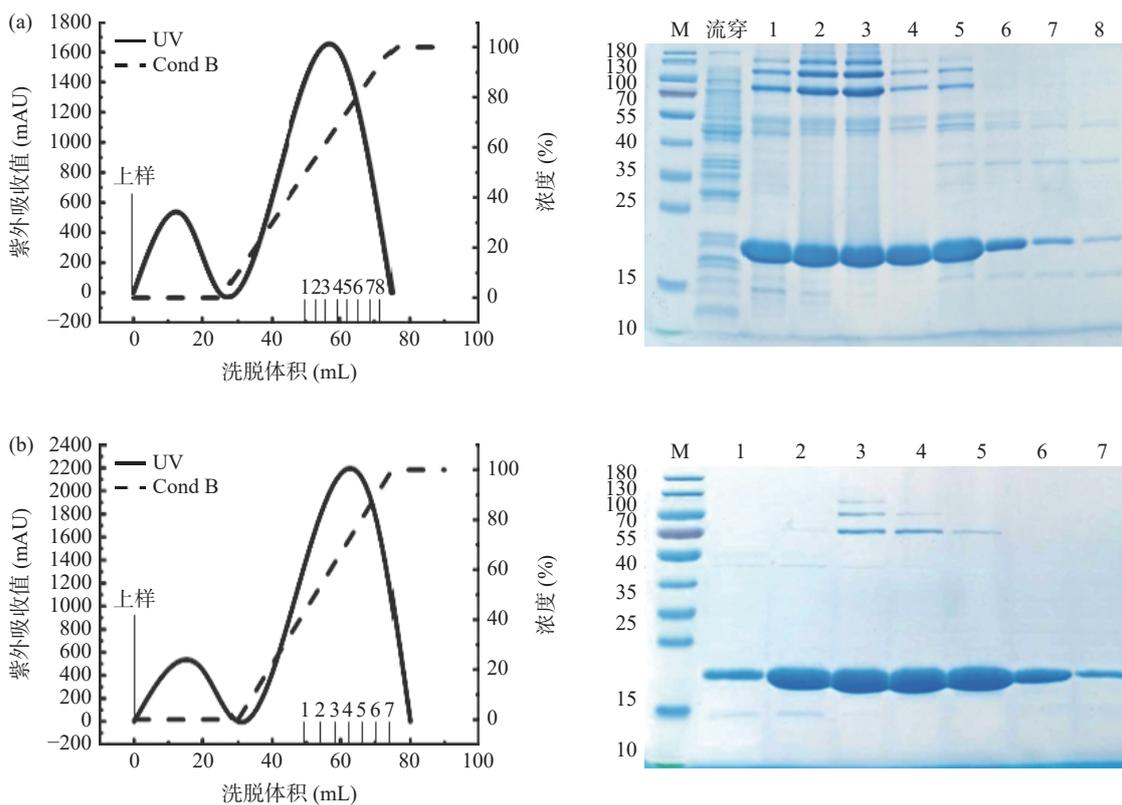


图2 亲和纯化分离蛋白峰图及 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 Peak diagram of protein isolated by affinity purification and SDS-PAGE electrophoresis

注: (a)Ni 柱亲和纯化(不含 DTT); (b)含 DTT 缓冲液 Ni 柱亲和纯化; M: 蛋白 Marker; 数字编号代表洗脱峰收集管号。

形成多聚体吸附在层析柱上随单体一起被洗脱下来, 可以通过改变缓冲液体系、pH、加入还原剂等方法提高纯化效果^[39]。本研究中采取在亲和层析的缓冲溶液中加入 1 mmol/L DTT, 利用其还原作用破坏杂蛋白的构象, 减少杂蛋白与镍柱的结合能力, 从而达到去除杂蛋白的目的。图 2(b)显示了缓冲液中含有 DTT 的纯化效果, 可以看出在 1 mmol/L DTT 的

作用下, 大大减少了杂蛋白的结合, 但仍有少量杂蛋白残留, 且分子量较大, 因此进一步地采用分子筛色谱利用分子量差异去除杂蛋白。结果如图 3 所示, 经由分子筛纯化后, 电泳结果显示在 18.6 kDa 处得到了条带非常单一的目的蛋白, 确定了两步法纯化方案, 所获得的纳米抗体经 Image J 软件分析纯度达到 98% 以上。

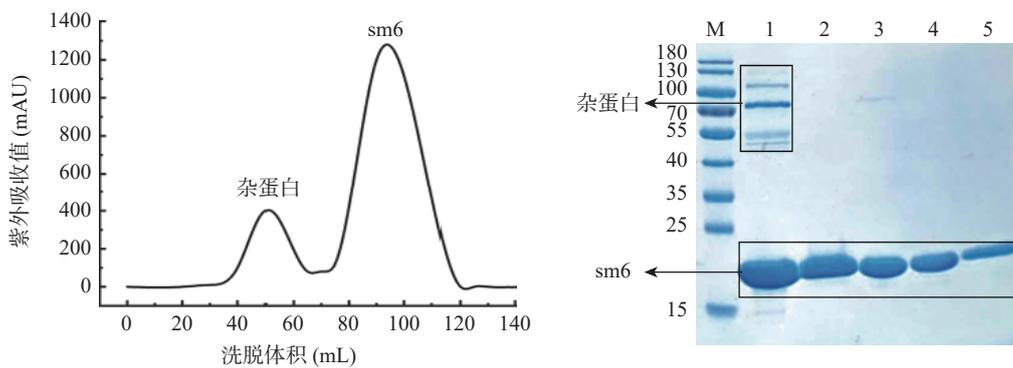


图3 凝胶过滤层析分离蛋白峰图及 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 Protein peaks separated by gel filtration chromatography and SDS-PAGE electrophoresis

注: M: 蛋白 Marker; 1-凝胶过滤层析前的抗体样品; 2~5-凝胶过滤层析后的抗体样品。

2.3 间接 ELISA 检测方法建立

在包被原浓度为 0.5 μg/mL, 抗体浓度为 900 ng 时, 在 PBS 缓冲溶液中建立抗杀螟硫磷纳米抗体的 ic-ELISA 标准曲线, 结果如图 4 所示。优化前低表达抗体检出限(IC₁₀)为 0.8 ng/mL, 线性范围为 1.5~

10.9 ng/mL^[27]; 优化后抗体所建立的 ic-ELISA 方法的 IC₅₀ 为 5.81 ng/mL, 检出限(IC₁₀)为 0.25 ng/mL, 线性范围为 0.78~43.07 ng/mL, 相较于优化前所建方法在检出限和检测范围上都有提升。目前已经报道的基于杀螟硫磷单克隆抗体在缓冲体系中建立的 ic-

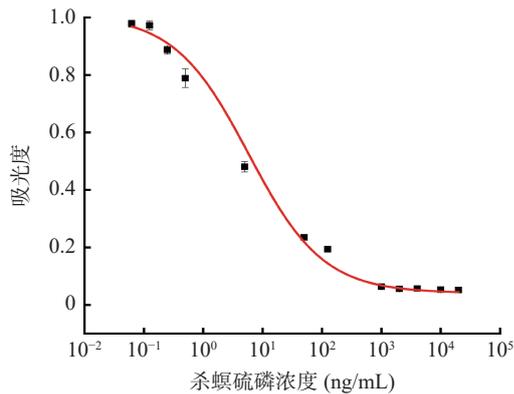


图 4 抗杀螟硫磷纳米抗体 ic-ELISA 标准曲线

Fig.4 Anti-fenitrothion nanobody ic-ELISA standard curve

ELISA 方法 IC_{50} 分别是为 8.72 ng/mL^[11]、120.7 ng/mL^[40], 多克隆抗体 LOD 为 12 ng/mL^[12], 基于 scFv 的 ELISA 方法 IC_{50} 为 3.4 ng/mL^[41], 本研究经表达和纯化优化后制备的 Nb 所建立的杀螟硫磷 ic-ELISA 检测方法与目前已经报道的基于单克隆抗体 ELISA 检测方法相比具有更高的灵敏度, 与报道的基于多克隆抗体和 scFv 的 ELISA 方法灵敏度相当, 表明本研究所制备获得的抗杀螟硫磷纳米抗体具有良好的检测活性。

2.4 样品添加回收

经过 QuEChERS 净化后的白菜和生菜样品提取液, 用 PBS 稀释 10、20、30 倍后直接用于 ic-ELISA 检测。建立标准曲线(见图 5)分析发现, 两种蔬菜样品提取液稀释 20 倍后标准曲线与 PBS 标准曲线重

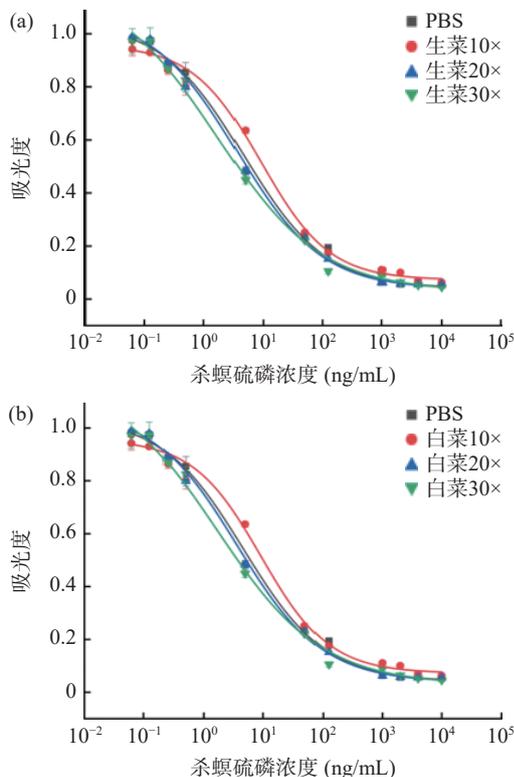


图 5 基质效应消除

Fig.5 Elimination of matrix effect

注: (a)生菜; (b)白菜。

合, 而稀释 10、30 倍的标准曲线与 PBS 标准曲线重合度较差, 影响样品中杀螟硫磷的定量检测效果。最终确定稀释 20 倍为消除基质效应的最小稀释倍数, 其检测线性范围为 0.33~46.08 ng/mL, 满足国家标准 GB 2763-2021 中规定的最大残留限量标准的检测。

在样品中添加低中高三个水平的杀螟硫磷标准药物, 采用上述的前处理方法处理样品, ic-ELISA 检测样品中的杀螟硫磷, 结果如表 1 所示, 两种果蔬样品的回收率在 93.3%~111.7% 之间, 变异系数(CV)值在 2.3%~18.2% 之间, 说明方法准确性较高, 误差在可接受范围内。

表 1 两种蔬菜样品添加回收实验

Table 1 Additive recovery experiment of two vegetable samples

样品	添标量 (ng/g)	平均值±标准偏差 (ng/g, n=3)	回收率 (%)	变异系数 (%)
生菜	1	1.1±0.2	110.0	18.2
	6	6.7±1.2	111.7	18.1
	36	36.4±0.1	101.2	2.3
白菜	1	0.9±0.1	93.3	16.3
	6	6.5±0.6	107.8	9.1
	36	36.7±1.3	101.8	3.5

3 结论

本研究通过优化抗杀螟硫磷纳米抗体在大肠杆菌表达体系中的培养条件, 增加了重组蛋白在周质腔中的可溶性表达量, 建立了获得高纯度抗杀螟硫磷纳米抗体的两步纯化法。经过优化后, 可以成功高效表达并纯化得到高纯度抗杀螟硫磷纳米抗体, 表达量为 6 mg/L, 纯度达到 98% 以上。此外, ic-ELISA 对纯化得到的纳米抗体建立标准曲线进行活性鉴定, 结果显示 IC_{50} 为 5.81 ng/mL, 检出限 LOD 为 0.25 ng/mL。选择生菜和白菜样品进行实际样品检测, 其检测线性范围为 0.33~46.08 ng/mL, 能够满足国标规定的杀螟硫磷最大残留限量监测需求, 为开发杀螟硫磷快速免疫检测方法做了准备, 也为后续抗杀螟硫磷纳米抗体结构、功能及相互作用机制研究奠定了基础。此外, 研究过程中发现在诱导温度过高时 IPTG 诱导剂浓度对表达水平的影响巨大, 不利于宿主菌正常生长, 不利于蛋白质可溶表达; 相反温度较低时 IPTG 诱导剂的用量对可溶性蛋白的表达量没有太大影响, 且诱导剂浓度与诱导温度对纳米抗体的表达存在交互效应, 为之后纳米抗体的异源表达提供了参考。

参考文献

- [1] HU H Y, YANG L Q. Development of enzymatic electrochemical biosensors for organophosphorus pesticide detection[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2021, 56(2): 168-180.
- [2] 叶茂, 沈晓玲, 陈青舟, 等. 胶体金免疫层析法同时检测果蔬中四种农药残留[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 300-308. [YE Mao, SHEN Xiaoling, CHEN Qingzhou, et al. Simultaneous determination of four pesticide residues in fruits and vegetables by colloidal gold immunochromatography[J]. *Science and Technology of*

- Food Industry, 2023, 44(6): 300–308.]
- [3] CANL A G, SÜRÜCÜ B, ULUSOY H İ, et al. Analytical methodology for trace determination of propoxur and fenitrothion pesticide residues by decanoic acid modified magnetic nanoparticles[J]. *Molecules*, 2019, 24(24): 4621.
- [4] 王艳, 赵宁, 李虹佳, 等. 电沉积法构建 AChE/COD@AuNPs 共固定化酶生物传感器差分脉冲伏安法快速检测有机磷农药[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(1): 356–363. [WANG Yan, ZHAO Ning, LI Hongjia, et al. Rapid detection of organophosphorus pesticides by differential pulse voltammetry with AChE/COD@AuNPs co-immobilized enzyme biosensor constructed by electrodeposition[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(1): 356–363.]
- [5] TRINH K H, KADAM U S, SONG J N, et al. Novel DNA aptameric sensors to detect the toxic insecticide fenitrothion[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10846.
- [6] 林珍珠. 泉州地区蔬菜有机磷农药残留检测分析[J]. *福建农业科技*, 2018(5): 46–48. [LIN Zhenzhu. Detection on organophosphorus pesticide residue in vegetables from Quanzhou area[J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2018(5): 46–48.]
- [7] 杨眉, 宋明雄, 业润泽. Spe-gcms/ms 法测定粮食中的 10 种有机磷[J]. *粮食科技与经济*, 2020, 45(5): 84–89. [YANG Mei, SONG Mingxiong, YE Runze. Determination of 10 kinds of organic phosphorus in grain by SPE-GCMS/MS[J]. *Grain Science and Technology and Economy*, 2020, 45(5): 84–89.]
- [8] 魏茂琼, 兰珊珊, 王丽, 等. 环境中毒死蜱的酶联免疫分析方法研究[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(12): 82–89. [WEI Maoqiong, LAN Shanshan, WANG Li, et al. Study on enzyme-linked immunosorbent assay for chlorpyrifos in environment[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(12): 82–89.]
- [9] 赵志高, 骆骄阳, 付延伟, 等. 免疫分析技术在农药残留分析中的研究进展及在中药中的应用展望[J]. *分析测试学报*, 2021, 40(1): 149–158. [ZHAO Zhigao, LUO Jiaoyang, FU Yanwei, et al. Research progress on immunoassay in pesticide residue analysis and its application prospect in Chinese herbal medicine[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(1): 149–158.]
- [10] QIE Zhiwei, HUANG Ziwei, GAO Zichen, et al. Pretreatment-integration for milk protein removal and device-facilitated immunochromatographic assay for 17 items[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 11630.
- [11] JIAO Shasha, LIU Pengyan, LIU Ying, et al. Binding properties of broad-specific monoclonal antibodies against three organophosphorus pesticides by a direct surface plasmon resonance immunosensor[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(28): 7263–7273.
- [12] YU Jicheng, GUO Tingting, ZHANG Wei, et al. Simultaneous detection of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion through lanthanide doped β -NaYF₄ upconversion nanoparticles with different emitting light colors[J]. *Materials Research Bulletin*, 2019, 111: 133–139.
- [13] CHO Y A, SEOK J A, LEE H S, et al. Synthesis of haptens of organophosphorus pesticides and development of immunoassays for fenitrothion[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 522(2): 215–222.
- [14] ZOU Rubing, CHANG Yunyun, ZHANG Tianyi, et al. Up-converting nanoparticle-based immunochromatographic strip for multi-residue detection of three organophosphorus pesticides in food[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7: 18.
- [15] CHEN Z J, ZHANG Y F, CHEN J L, et al. Production and characterization of biotinylated anti-fenitrothion nanobodies and development of sensitive fluoroimmunoassay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(13): 4102–4111.
- [16] RODRÍGUEZ-CARMONA E, CANO-GARRIDO O, DRAGOSITS M, et al. Recombinant fab expression and secretion in *Escherichia coli* continuous culture at medium cell densities: Influence of temperature[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(3): 446–452.
- [17] OZAKI C Y, SILVEIRA C R, ANDRADE F B, et al. Single chain variable fragments produced in *Escherichia coli* against heat-labile and heat-stable toxins from enterotoxigenic *E. coli*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e131484.
- [18] 何晓婷, 董洁娟, 沈兴, 等. 纳米抗体的稳定性及其结构基础研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49(6): 1004–1017. [HE Xiaoting, DONG Jiexian, SHEN Xing, et al. Advances on the relationship between stability and structure of nanobody: A review[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2022, 49(6): 1004–1017.]
- [19] VALDÉS-TRESANCO M S, MOLINA-ZAPATA A, POSE A G, et al. Structural insights into the design of synthetic nanobody libraries[J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2198.
- [20] SIMÕES B, GUEDENS W J, KEENE C, et al. Direct immobilization of engineered nanobodies on gold sensors[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2021, 13(15): 17353–17360.
- [21] REZAEI L, SHOJAOSADATI S A, FARAHMAND L, et al. Enhancement of extracellular bispecific anti-MUC1 nanobody expression in *E. coli* BL21 (DE3) by optimization of temperature and carbon sources through an autoinduction condition[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2020, 20(8): 338–349.
- [22] ADAMS A M, KAPLAN N A, WEI Z Y, et al. *In vivo* production of psilocybin in *E. coli*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 56: 111–119.
- [23] TAKAYAMA Y, AKUTSU H. Expression in periplasmic space of *Shewanella oneidensis*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 56(1): 80–84.
- [24] GOPHNA U, IDESES D, ROSEN R, et al. OmpA of a septicemic *Escherichia coli* O78--secretion and convergent evolution[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294(6): 373–381.
- [25] ZHOU Hui, HE Cong, LI Zhenfeng, et al. Development of a rapid gold nanoparticle immunochromatographic strip based on the nanobody for detecting 2,4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. *Biosensors*, 2022, 12(2): 84.
- [26] LUO Lin, LIN Shiqi, WU Zhuoyu, et al. Nanobody-based fluorescent immunoassay using carbon dots anchored cobalt oxyhydroxide composite for the sensitive detection of fenitrothion[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 439: 129701.
- [27] 王宇, 张译丰, 沈玉栋, 等. 抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体的制备及其在免疫检测方法中的应用[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(8): 286–294. [WANG Yu, ZHANG Yifeng, SHEN Yudong, et al. Production of anti-fenitrothion biotinylated nanobody and the application in the development of immunoassay[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(8): 286–294.]
- [28] 刘晓丽, 闫千千, 闫浩浩, 等. 登革病毒 ns2b-ns3 蛋白酶在大肠埃希菌中表达条件的优化及酶活性测定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2023: 1–8. [LIU Xiaoli, YAN Gangan, YAN Haohao, et al. Optimization of expression conditions of dengue virus NS2B-NS3 protease in *E. coli* and determination of enzyme activity[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2023: 1–8.]
- [29] 赵烨清, 石莉, 欧阳臻, 等. 化学-渗透压法温和破碎处理下大肠杆菌细胞胞内蛋白质的释放率[J]. *江苏农业科学*, 2017,

- 45(19): 146–149. [ZHAO Yeqing, SHI Li, OU Yangzhen, et al. Intracellular protein release rate of *Escherichia coli* cells treated by chemical-osmotic pressure and mild crushing[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(19): 146–149.]
- [30] GROTE A, HILLER K, SCHEER M, et al. JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33: W526–W531.
- [31] WEBSTER G R, TEH A Y, MA J K. Synthetic gene design—the rationale for codon optimization and implications for molecular pharming in plants [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(3): 492–502.
- [32] SADR V, SAFFAR B, EMAMZADEH R. Functional expression and purification of recombinant hepcidin25 production in *Escherichia coli* using SUMO fusion technology [J]. *Gene*, 2017, 610: 112–117.
- [33] HABIB I, SMOLAREK D, HATTAB C, et al. VHH (nanobody) directed against human glycophorin A: A tool for autologous red cell agglutination assays [J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 438(1): 82–89.
- [34] DVORAK P, CHRAST L, NIKEL P I, et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21 (DE3) carrying a synthetic metabolic pathway [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 201.
- [35] MALAKAR P, VENKATESH K V. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 2543–2549.
- [36] ZHANG Z, KUIPERS G, NIEMIEC Ł, et al. High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG [J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14(1): 142.
- [37] WANDREY G, BIER C, BINDER D, et al. Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-throughput screening system [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 63.
- [38] JIN Weixin, XING Zizhuo, SONG Yuanli, et al. Protein aggregation and mitigation strategy in low pH viral inactivation for monoclonal antibody purification [J]. *MAbs*, 2019, 11(8): 1479–1491.
- [39] 史伟, 禹婷. 蛋白质的层析分离 [J]. *内蒙古农业科技*, 2011(1): 110–112. [SHI Wei, YU Ting. Protein chromatography separation [J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2011(1): 110–112.]
- [40] LIU Yihua, GUO Yirong, ZHU Guonian, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of five organophosphorus pesticides in camellia oil [J]. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(7): 1178–1183.
- [41] LUO Yihui, XIA Yuxian. Selection of single-chain variable fragment antibodies against fenitrothion by ribosome display [J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(1): 130–137.