

微囊藻毒素纳米抗体的制备及其间接竞争酶联免疫分析方法的建立

司睿, 吴广培, 王锋, 雷红涛, 王弘*

(华南农业大学食品学院 广东省食品质量与安全重点实验室)

畜产品精准加工与安全控制技术国家地方联合工程研究中心(广东) 广州 510642)

摘要 微囊藻毒素(MC)作为肝毒性最强的藻毒素之一,在受污染的水体中时常检出,严重威胁着人畜饮水安全,加强其检测十分重要。在前期研究中,已成功构建抗 MC-LR 噬菌体展示纳米抗体文库。本研究以 MC-LR-OVA 作为包被原,经 4 轮固相淘筛,获得纳米抗体 M110。该抗体可识别 MC-LR,且具有良好的稳定性。基于纳米抗体 M110 建立了检测 MC-LR 的间接竞争酶联免疫分析法(ic-ELISA),检测的半抑制浓度 IC₅₀ 值为 3.55 ng/mL,检测限 0.65 ng/mL,线性范围 1.28~9.88 ng/mL。与 UPLC-MS/MS 方法检测结果相关系数达 0.998,提示本方法可用于水体中微囊藻毒素残留的检测。

关键词 微囊藻毒素; 纳米抗体; 淘筛; 间接竞争酶联免疫分析法

文章编号 1009-7848(2022)05-0332-06 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.05.035

微囊藻毒素(Microcysin, MC)是一种天然小分子毒素^[1],由蓝藻产生并释放到水体中^[2],主要有 MC-LR、MC-LA、MC-LY、MC-LW、MC-LF、MC-YR、MC-WR、MC-RR 等 8 种异构体^[3],其中 MC-LR 毒性最强^[4],普通水厂净化不能有效去除,严重威胁人畜饮用水安全。1996 年,巴西一透析中心的透析液被 MC-LR 污染,导致至少 26 人死亡^[5]。而在我国,2007 年太湖蓝藻爆发导致整个无锡市的饮用水污染^[6]。此外,在长江、黄河、松花江中下游等主要河流以及鄱阳湖、武汉东湖、上海淀山湖等几大淡水湖泊中,均检测到 MC-LR。构建藻毒素的快速检测方法十分必要。

免疫分析方法是一种基于抗原与抗体特异性识别的检测技术^[7],由于特异性强、灵敏度高等优点而被广泛应用于检测分析中^[8-9]。近年来,免疫分析方法发展迅速,其中以酶联免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)应用最广泛^[10]。对于免疫分析方法而言,制备高质量的

抗体是其重点与难点所在^[11]。与传统多克隆抗体和单克隆抗体相比,仅由重链可变区组成的纳米抗体(Nanobody, Nb)具有稳定性强、易表达、易于基因工程操作等特性^[12-13],在免疫检测方面的应用优势越来越受到人们的关注。

本研究基于实验室前期已构建好的噬菌体展示纳米抗体文库^[14],采用固相亲和淘筛的方法,制备得到特异性识别 MC-LR 的纳米抗体,建立 MC-LR 的间接竞争酶联免疫分析方法,并将其应用于实际样品中 MC-LR 的检测。

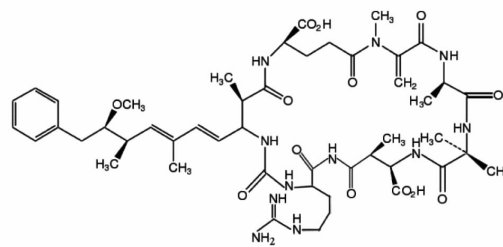


图 1 微囊藻毒素-LR 结构式

Fig.1 The structure of MC-LR

收稿日期: 2021-05-08

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2019 YFE0116600);国家自然科学基金项目(31972157);广东省重点领域研发计划项目(2019B020211002);广州市科技计划项目(202102080615);广东省高等学校珠江学者岗位计划项目(2017)

作者简介: 司睿(1993—),男,硕士生

通信作者: 王弘 E-mail: gzwzhongd@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MCs 标准品,台湾 Algal 公司;大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株,全式金生物公司;大肠杆菌 ER2738 菌株,美国 Lucigen 公司;TMB 显色液,北京索莱宝科技有限公司;兔抗 VHH-HRP 多克隆抗体,南京金斯瑞科技有限公司;辅助噬菌体 M13K07,

NEB 生物科技有限公司;M13 噬菌体抗体, 美国 GE 公司;引物合成及测序由广州睿博公司完成。

1.2 仪器与设备

NanoDrop 2000C 分光光度计、SORVALL LYNX 4000 centrifuge 离心机、Multiskan MK3 酶标仪, 美国 Thermo 公司;蛋白电泳仪、Biologic LP 蛋白纯化仪、GDS7500 凝胶成像仪, 美国 BIORAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 噬菌体展示纳米抗体文库的筛选与鉴定

采用固相亲和淘筛方法, 对已构建好的纳米抗体文库进行 4 轮筛选, 每轮包被不同质量浓度微囊藻毒素-鸡蛋白蛋白偶联物 MC-LR-OVA (10, 2.5, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。用磷酸盐缓冲液(吐温)洗涤 2 次, 每轮选用不同封闭液封闭 3 h。将 100 μL 纳米抗体文库加入包被原孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 1 h。第 1~3 轮淘筛加入药物进行竞争洗脱, 质量浓度依次为 2, 0.5, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 第 4 轮为 10 mg/mL 胰蛋白酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1 h, 重复洗脱 1 次, 混合两次洗脱液即为各轮淘筛产物。取 10 μL 洗脱液计算滴度, 其余进行扩增后用于下一轮的淘筛。从第 4 轮的平板上随机挑取 20 个单克隆进行深孔板表达, 用 ic-ELISA 方法检测其活性。根据测定结果, 抑制率(Inhibition rate, I) 计算公式如下:

$$I(\%) = \left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100$$

式中, B_0 ——MC-LR“0”质量浓度孔对应的吸光值; B ——MC-LR 标准溶液孔对应的吸光值。

1.3.2 抗 MC-LR 纳米抗体的表达纯化与性能分析 将含有抗 MC-LR 纳米抗体基因的 pComb3XSS 质粒转化至表达宿主大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 表达条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 、1% 接种量、0.1 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷, 采用冻融法提取菌体周质腔, 经镍柱亲和纯化获得纳米抗体。利用 ic-ELISA 方法, 研究其热稳定性及有机溶剂耐受性。

1.3.3 基于抗 MC-LR 纳米抗体 M110 的 ic-ELISA 的方法建立 用包被液将包被抗原 MC-LR-OVA 稀释至 1 000 ng/mL , 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入到酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。次日, 用 1% 鱼胶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭

3 h。向酶标板内加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的纳米抗体及 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 不同质量浓度的 MC-LR 标准品溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min。用 PBST 洗涤 5 次, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的兔抗 VHH-HRP 抗体(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40 min。用 PBST 洗涤 5 次后, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的 TMB 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 10% 的 H_2SO_4 溶液终止后, 测定 $A_{450\text{nm}}$ 吸光值。

1.3.4 样品添加回收及方法准确性分析 取车陂涌华南农业大学段水样, 参照国标 GB/T 20466-2006《水中微囊藻毒素的测定》的检测方法, 以建立的 ic-ELISA 方法对样品进行检测, 并与 UPLC-MS/MS 检测结果进行比对, 评价方法的可靠性。

2 结果与分析

2.1 噬菌体展示纳米抗体文库的淘筛

以 MC-LR 为免疫原, 本课题组在试验前期已成功构建库容量为 8.33×10^7 CFU/mL VHH 基因文库。经辅助噬菌体 M13K07 救援后, 获得滴度为 1.0×10^{12} PFU/mL 噬菌体展示纳米抗体文库。

以 MC-LR-OVA 为包被原, 对噬菌体展示纳米抗体文库进行 4 轮淘筛, 从第 4 轮筛选的洗脱产物测定平板上随机挑选 20 个克隆, 用 ic-ELISA 鉴定其活性, 结果如图 2 所示。最终获得抗 MC-LR 纳米抗体 2 株: M110 和 M207, 其序列信息如图 3 所示。采用 ic-ELISA 检测抗体活性, 选择抑制特异性较好的 M110 克隆 ($I=97.26\%$) 用于后续研究。

2.2 纳米抗体 M110 的表达纯化及性能分析

表达纯化后的纳米抗体经 SDS-PAGE 和免疫印迹验证(图 4), 纯度可达 90% 以上, 表达量为 3.5 mg/L 。稳定性分析结果表明(图 5), 纳米抗体

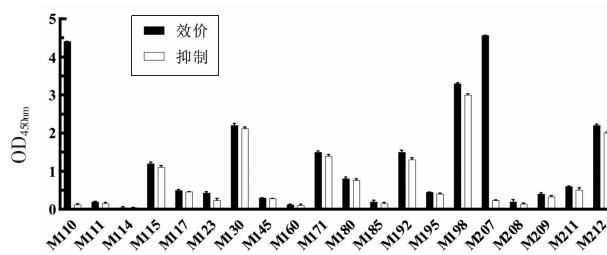
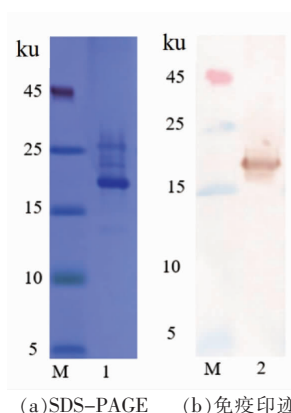


图 2 ic-ELISA 鉴定特异性阳性克隆
Fig.2 Identification of specific positive clones by ic-ELISA



图3 M110、M207序列比对

Fig.3 Sequence alignment of M110 and M207



(a) SDS-PAGE (b) 免疫印迹

注: M表示标准蛋白;泳道1与泳道2均为纯化后的M110。

图4 SDS-PAGE(a)和免疫印迹(b)验证纯化后纳米抗体M110

Fig.4 Identification of the purified nanobody M110 by SDS-PAGE (a) and western blotting (b)

M110在90℃孵育1h,仍具备超过60%的抗原结合活性,且在体积分数40%甲醇或乙腈中仍具有

超过80%的活性,这显示该抗体具有较好的热稳定性和有机溶剂耐受性。

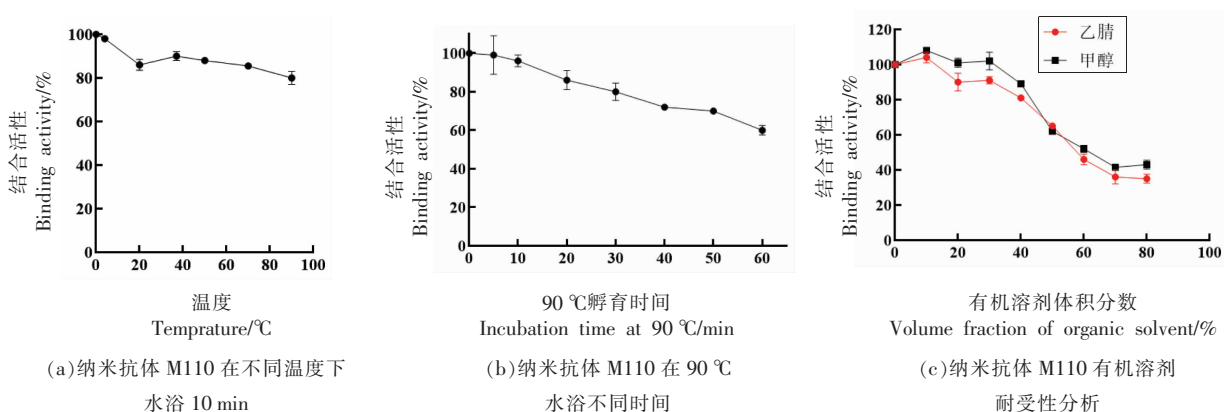


图5 纳米抗体M110热稳定性和有机溶剂耐受性分析

Fig.5 Thermal stability and organic solvents tolerance of nanobody M110

2.3 基于纳米抗体M110的ic-ELISA方法建立及灵敏度和特异性评价

2.3.1 基于纳米抗体M110的ic-ELISA方法建

立 建立基于纳米抗体M110检测MC-LR的ic-ELISA方法,绘制竞争抑制标准曲线^[14]。如图6所示,其 IC_{50} 为3.55 ng/mL,线性范围为1.28~9.88

ng/mL, 检测限为 0.652 ng/mL, 其与所有藻毒素类毒素均有交叉(表 1), 可能的原因是藻毒素均有一个共同的结构域 Adda, 纳米抗体 M110 能够识别的区域是 Adda。

2.3.2 样品添加回收及方法准确性分析 分别对水样添加不同质量浓度 MC-LR 标准品(0.5, 1, 2

ng/mL) 进行添加回收试验, 采用 UPLC-MS/MS 方法对 ic-ELISA 方法进行验证, 其结果见表 2, ic-ELISA 方法回收率为 111.0%~119.3%, 从图 7 中可以看出, 两种方法的结果相关系数达 0.999, 结果表明 ic-ELISA 方法检测准确性良好。

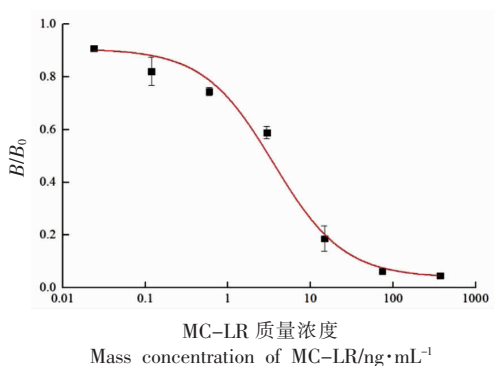


图 6 基于纳米抗体 M110 的 ic-ELISA 方法检测 MC-LR 的标准曲线 ($n=3$)

Fig.6 The standard curve of ic-ELISA for detecting MC-LR based on nanobody M110 ($n=3$)

表 1 纳米抗体 M110 与藻毒素的交叉率 ($n=3$)

Table 1 The crossover rate between nanobody M110 and algal toxin ($n=3$)

藻毒素	交叉率/%
MC-LR	100.0
MC-LA	224.4
MC-LY	82.6
MC-LW	36.7
MC-LF	52.5
MC-YR	168.4
MC-WR	99.3
MC-RR	41.0
NOD	48.4

注: NOD. 节球藻毒素。

表 2 基于 M110 的 ic-ELISA 方法检测水样中 MC-LR 的回收率 ($n=3$)

Table 2 Recovery of MC-LR in water samples detected by ic-ELISA based on M110 ($n=3$)

加标质量浓度/ ng·mL ⁻¹	浓缩后质量浓度/ ng·mL ⁻¹	ic-ELISA		UPLC-MS/MS	
		检出值/ng·mL ⁻¹	回收率/%	检出值/ng·mL ⁻¹	回收率/%
0	0	-	-	-	-
0.5	20	23.5 ± 0.9	117.7 ± 3.6	21.1 ± 0.4	105.4 ± 1.9
1	40	44.4 ± 2.6	111.0 ± 5.8	42.9 ± 0.8	107.2 ± 1.9
2	80	95.5 ± 0.9	119.3 ± 2.0	93.1 ± 1.4	116.4 ± 1.5

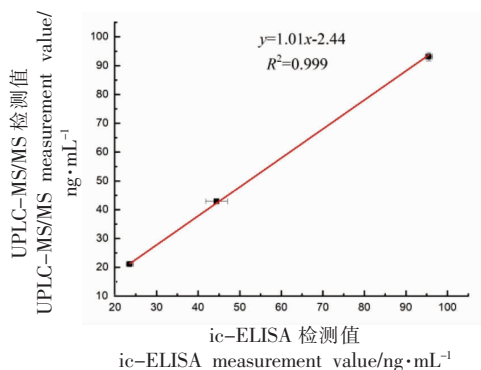


图 7 ic-ELISA 和 UPLC-MS/MS 方法检测水样中 MC-LR 的结果比对 ($n=3$)

Fig.7 Results comparison of MC-LR in water samples detected by ic-ELISA and UPLC-MS/MS ($n=3$)

3 结论

纳米抗体因其特性, 被广泛应用于医疗方面, 近年来也被广泛应用于小分子污染物检测中。本研究构建了针对 MC-LR 的纳米抗体文库, 库容量为 8.33×10^7 CFU/mL。并通过亲和淘筛获得 MC-LR 纳米抗体 M110, 建立了 MC-LR 的 ic-ELISA 方法, 其 IC_{50} 为 3.55 ng/mL。将该方法应用于水样中 MC-LR 的检测, 并利用 UPLC-MS/MS 方法进行仪器比对, 该 ic-ELISA 方法准确性好、灵敏度高, 制备的纳米抗体 M110 还具有较好的热稳定性与有机溶剂耐受性, 可用于免疫快速检测试剂盒的开发研究。

参 考 文 献

- [1] KELETI G, SYKORA J L. Production and properties of cyanobacterial endotoxins[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(1): 104-109.
- [2] 隋海霞, 陈艳, 严卫星, 等. 淡水湖泊中微囊藻毒素的污染 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2004 (2): 112-114.
SUI H X, CHEN Y, YAN W X, et al. Pollution of microcystin in fresh water lakes[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2004(2): 112-114.
- [3] XU C X, YANG Y, LIU L W, et al. Microcystin-LR nanobody screening from an alpaca phage display nanobody library and its expression and application [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 151: 220-227.
- [4] 王莎飞, 郭彩荣, 徐向阳, 等. 环境水体藻毒素生物处理技术研究进展 [J]. *应用生态学报* 2016, 27 (5): 1683-1692.
WANG S F, GUO C R, XU X Y, et al. Review on biological treatment of cyanobacterial toxin in natural waters[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 27 (5): 1683-1692.
- [5] POURIA S, DE ANDRADE A, BARBOSA J, et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [J]. *The Lancet*, 1998, 352 (9121): 21-26.
- [6] 于建伟, 李宗来, 曹楠, 等. 无锡市饮用水嗅味突发事件致嗅原因及潜在问题分析[J]. *环境科学学报*, 2007, 27(11): 1771-1777.
YU J W, LI Z L, CAO N, et al. Analyses on cause for odor and potential problems in water source during odor episode event in Wuxi[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 27 (11): 1771-1777.
- [7] HOU S L, MA J J, CHENG Y Q, et al. One-step rapid detection of fumonisin B-1, deoxynivalenol and zearalenone in grains [J]. *Food Control*, 2020, 117: 107107.
- [8] SELVARAJ J N, WANG Y, ZHOU L, et al. Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: A review [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2015, 32(4): 440-452.
- [9] ZHANG J R, WANG Y, DONG J X, et al. Development of a simple pretreatment immunoassay based on an organic solvent-tolerant nanobody for the detection of carbofuran in vegetable and fruit samples [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 576.
- [10] XU C X, YANG Y, LIU L W, et al. Microcystin-LR nanobody screening from an alpaca phage display nanobody library and its expression and application [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 151: 220-227.
- [11] LU N, LING L, GUAN T, et al. Broad-specificity ELISA with a heterogeneous strategy for sensitive detection of microcystins and nodularin [J]. *Toxicon*, 2020, 175: 44-48.
- [12] ZHANG Y Q, XU Z L, WANG F, et al. Isolation of bactrian camel single domain antibody for parathion and development of one-step dc-FEIA method using VHH-alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90 (21): 12886-12892.
- [13] 蔡家麟, 夏立亮, 潘欣, 等. 重链抗体的结构特点及其应用前景分析 [J]. *生命科学* 2013, 25(9): 853-857.
CAI J L, XIA L L, PAN X, et al. Structure properties of heavy chain antibody and its future application[J]. *Life Sciences*, 2013, 25(9): 853-857.
- [14] ZHANG J R, WANG Y, DONG J X, et al. Development of a simple pretreatment immunoassay based on an organic solvent-tolerant nanobody for the detection of carbofuran in vegetable and fruit samples [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 576.
- [15] 张玉琪, 张瑾如, 王锋, 等. 对硫磷纳米抗体筛选及分子识别机制研究[J]. *分析化学* 2019, 47(9): 1419-1428.
ZHANG Y Q, ZHANG J R, WANG F, et al. Selection of nanobody and recognition mechanism between nanobody and parathion [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 47(9): 1419-1428.

Preparation of Microcystin Nanobody and Establishment of Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Microcystin

Si Rui, Wu Guangpei, Wang Feng, Lei Hongtao, Wang Hong*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, National-Local Joint Engineering Research Center for Processing and Safety Control of Livestock and Poultry Products (Guangdong), College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract Microcystin (MC), as one of the most toxic hepatotoxins, is often detected in polluted water bodies, which seriously threatens the safety of drinking water for humans and animals. It is very important to develop its rapid detection methods. In the previous study, an anti-MC-LR phage display nanobody library was successfully constructed. In this study, using MC-LR-OVA as the coating antigen, the anti-MC-LR nanobody M110 was selected by four rounds solid phase biopanning. M110 could recognize MC-LR with good stability. Further, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) for the detection of MC-LR was established, with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 3.55 ng/mL. The detection limit was 0.65 ng/mL and the linear range was 1.28–9.88 ng/mL. The correlation coefficient of ic-ELISA and UPLC-MS/MS was 0.998, indicating the M110-based ic-ELISA method has high accuracy and can be used for the actual detection of MC-LR residues in water sample.

Keywords microcystin; nanobody; biopanning; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay