

基于纳米抗体-荧光素酶的黄曲霉毒素 B1 检测方法构建

陈文星^{1,2}, 王凤华^{1,2}, 谭晓亮², 晏石娟², 张军^{1*}, 吴绍文^{2*}

(¹ 甘肃农业大学资源与环境学院 兰州 730070

² 猪禽种业全国重点实验室 广东省农作物种质资源保存和利用重点实验室
广东省农业科学院农业生物基因研究中心 广州 510640)

摘要 黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 是一种剧毒、致癌的食源性污染物, 严重威胁食品安全和公共健康。为开发快速检测 AFB1 的生物发光酶联免疫分析 (BLEIA) 方法, 系统测试了 3 种抗 AFB1 特异性纳米抗体 (NB) 与纳米荧光素酶 (Nluc) 融合蛋白 (G8-Nluc、Nluc-NB26 和 Nluc-NB28) 的可溶性表达、纯化情况及酶催化活性。基于 3 种融合蛋白分别建立 BLEIA 检测体系, 选择 Nluc-NB26 用于谷物样品的分析和验证。结果表明, Nluc-NB26 的可溶性表达量最高, 稳定性更好, Nluc-NB28 的可溶性表达量次之, 而 G8-Nluc 基本不可溶。不同表面活性剂对 G8-Nluc 的促溶解性研究表明, 添加 *N*-月桂酰肌氨酸钠可显著提高其溶解度, 纯化得到的 3 种融合蛋白均具有良好的酶活性及抗原结合活性。基于融合蛋白的 BLEIA 检测结果显示, Nluc-NB28-BLEIA、G8-Nluc-BLEIA 和 Nluc-NB26-BLEIA 体系检测 AFB1 的 IC₅₀ 值分别为 4.213, 1.697, 2.169 ng/mL, 表明 G8-Nluc-BLEIA 体系的灵敏度最高, Nluc-NB26-BLEIA 与前者接近, Nluc-NB28-BLEIA 最低。综合考虑融合蛋白的可溶性表达量、稳定性及检测性能, 对 Nluc-NB26-BLEIA 开展实际样品的分析和验证, 结果表明: 这一方法检测谷物中 AFB1 的平均回收率在 91.1%~104.1% 之间, 与商业化酶联免疫吸附测定试剂盒结果相似, 而检测的时间和试剂成本明显降低。研究结果为开发快速、高灵敏的 AFB1 检测技术提供参考。

关键词 黄曲霉毒素 B1; 纳米抗体; 纳米荧光素酶; 快速检测; 生物发光酶联免疫分析

文章编号 1009-7848(2024)04-0349-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.04.033

玉米、小麦和花生等油料作物容易被黄曲霉菌、寄生曲霉菌等曲霉类真菌侵染, 从而积累黄曲霉毒素^[1]。误食被黄曲霉毒素污染的食物会导致人体产生癌症、肝损伤、免疫缺陷等多种重大疾病, 禽畜误食则会产生免疫抑制, 营养物质吸收不良, 先天畸形等致畸效应, 严重危害人类和禽畜的生命健康^[2]。黄曲霉毒素主要包括 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 等 4 种类型, 其中 AFB1 是自然界中毒性最强的化合物, 被国际癌症研究机构确定为 1 类致癌物^[1-2]。AFB1 的化学结构稳定, 不容易在食品加工和烹饪过程中被破坏, 能够长期在食物链中积累, 从而造成公共卫生事件和重大经济损

失^[3]。因此, 准确检测 AFB1 的污染水平, 防止其进入食物链, 对人畜健康造成危害, 对于保障公共卫生和食品安全具有重要意义。

当前, AFB1 的检测技术主要包括高效液相色谱法、液相色谱-质谱法和免疫分析法等 3 种方法^[3-8]。其中, 高效液相色谱法操作成熟可靠, 然而检测仪器昂贵, 需要专业操作人员, 样品前处理也较为复杂。质谱法灵敏度虽高但仪器昂贵。相比之下, 免疫分析法基于抗原和抗体的特异性识别, 操作简便、快速, 是目前进行 AFB1 大规模筛查的主要技术之一^[3,9]。常用的免疫分析方法有酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和胶体金免疫层析法等^[10]。然而, 这些传统免疫分析技术存在步骤繁琐、灵敏度较低、单克隆抗体获取难度大等问题, 难以满足快速、高通量筛查的需求。

近年来, 纳米抗体和纳米荧光素酶的研发促进了生物发光酶联免疫分析技术 (BLEIA) 的发展^[11-14]。纳米抗体为抗体重链可变区组成的单域抗体, 具有热稳定性高、耐有机溶剂等特征, 是目前

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 广州市基础科学计划基础与应用基础项目 (SL2022A04J00899); 国家自然科学基金项目 (22307022); 甘肃省自然科学基金项目 (23JRRA1413); 甘肃省科技厅重点研发计划-农业领域 (23YFNA0036)

第一作者: 陈文星, 女, 硕士生

通信作者: 张军 E-mail: zhangjun@gsau.edu.cn

吴绍文 E-mail: wushaowen@agrogene.ac.cn

已知的单域抗体中分子质量最小且结合能力最强的一类^[15-17]。纳米荧光素酶 Nluc 是一种分泌型荧光素酶,具有体积小,结构稳定性高,不需外源激发就可发光,半衰期长和发光强度高优点,已逐渐成为生物发光检测常用工具之一^[18-22]。纳米抗体和纳米荧光素酶的分子质量小,可通过基因工程的方法融合后在原核系统中高效表达,并保留各自的优异性能^[23]。以纳米荧光素酶、纳米抗体作为核心元件的免疫分析方法,无需多步反应,操作简便,非常适合食品和环境样本中各类分析物的快速、高灵敏检测,并被广泛应用^[11-12,23-29]。

近期,Ren 等^[23]构建了抗 AFB1 特异性纳米抗体 G8 与 Nluc 的融合蛋白,这一融合蛋白 G8-Nluc 保留了纳米抗体的 AFB1 结合活性及 Nluc 的酶催化活性。基于这一融合蛋白建立的 BLEIA 方法检测 AFB1 的灵敏度比 ELISA 方法提高了近 20 倍。然而,这一 G8 抗体的可溶性差,需要使用商业化的包涵体蛋白纯化试剂盒提纯,且只能获得少量可溶性产物,大大限制了该方法的推广应用。目前,NB26、NB28 和 G8 等 3 种抗 AFB1 特异性纳米抗体已被报道,它们在不同检测平台中的性能各异,而在 BLEIA 体系下的系统性比较尚未见报道^[23,30-34]。比较这 3 种纳米抗体的蛋白性质及其在 BLEIA 体系下的检测性能,以确定它们的优、劣性,对于建立低成本、高灵敏度和更好地满足实际需求的 AFB1 检测方法具有指导意义。

本研究构建 G8、NB26 和 NB28 3 种纳米抗体与 Nluc 的融合蛋白(Nluc-NB26、Nluc-NB28 和 G8-Nluc),系统比较它们在大肠杆菌中的表达量、可溶性、稳定性和 BLEIA 体系中的检测性能。综合分析可溶性蛋白表达量、纯化和检测灵敏度的结果,进一步使用 Nluc-NB26-BLEIA 体系对实际样品进行分析,并与商业化 ELISA 试剂盒比较,为构建高效的 AFB1 生物发光酶联免疫分析体系提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5a 和 BL21 (DE3)菌株及 pET.M.3C 质粒为本课题组保存;质粒小提试剂盒,北京天根公司;琼脂糖凝胶回收试

剂盒,北京索莱宝公司;限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI、蛋白质 Maker、DNA Maker、TaKaRa 公司;96 孔白色高结合酶标板,Costar 公司;AFB1-BSA 偶联抗原,深圳安提生物公司;真菌毒素标准品,坛墨质检公司;荧光素酶底物 *coelenterazine-H* (CTZ-h),美仑生物公司;DNA 合成、重组质粒构建、测序均由苏州硅基生物公司完成;其它常用分析纯级生化试剂均从广州谊科园生物科技公司、生工生物工程(上海)股份有限公司等标准供应商购买。

1.2 仪器与设备

AKTA Explorer 100 蛋白纯化仪,美国通用电气公司;Varioskan Flash 多功能酶标仪、NanoDrop 1000 紫外-可见分光光度计,美国赛默飞公司;ChemiDoc XRS 化学发光凝胶成像系统、电泳仪,美国伯乐公司;超声波细胞破碎仪,美国 Sonics Vibra-Cell 公司;Avanti J-26xp 落地式大容量高速离心机,美国贝克曼公司。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建与验证 纳米抗体 NB26、NB28 及 G8-Nluc 融合蛋白的氨基酸序列从文献中获得^[2,4,14],将 Nluc 的氨基酸序列融合到 NB26/NB28 的 N 端,并以 GSGSGSGSGGS(Linker)-序列进行连接,从而得到 Nluc-NB26 和 Nluc-NB28 融合蛋白。3 种融合蛋白及单独 Nluc 的氨基酸序列根据大肠杆菌优化密码子得到相应的核苷酸序列,并由苏州硅基生物科技有限公司合成。随后,这些合成的序列分别通过限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 的酶切位点插入表达载体 pET.M.3C,从而获得重组质粒。重组质粒经双酶切和测序验证后用于蛋白的表达纯化。

1.3.2 纳米荧光素酶-纳米抗体融合蛋白的表达纯化和稳定性分析 将测序正确的重组质粒转化于大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养;挑取平板中的单菌落接种于含 Amp 的 10 mL LB 液体培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C,220 r/min 恒温摇床中培养 14 h。将菌液以 1:100 的比例接种于 1 L 新鲜的 LB 培养基,并在 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时冷却至 16 $^{\circ}$ C。之后在上述 1 L 菌液中加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 进行蛋白诱导表达,并在

16 ℃, 220 r/min 恒温摇床中继续培养 16~18 h。培养完成后, 5 000 r/min, 4 ℃离心 15 min 收集菌体, 使用 25 mL 的裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L imidazole, 1 mmol/L PMSF, pH 7.9) 重悬菌体。在冰浴中超声处理 (20 kHz, 130 W, 超声 5 s 停 5 s, 共 15 min) 破碎菌体, 12 000 r/min, 4 ℃离心 30 min 后, 使用镍亲和柱从上清液中富集带有 His 标签的融合蛋白, 并使用洗脱液 (20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 1 mol/L imidazole, pH 7.9) 进行洗脱。最后使用蛋白纯化仪 AKTA 和预先平衡的 HiLoad 16/600 Superdex 75 μ g 层析柱对上述洗脱液进一步纯化。SDS-PAGE 凝胶电泳分析确定目标蛋白的组分, 对这一组分收集并使用超滤管浓缩, 液氮速冻后于 -80 ℃保存。

为评估融合蛋白的稳定性, 本研究采用液氮冻融法^[35]。取浓度为 0.2 mmol/L 的融合蛋白各 100 μ L, 分装入离心管中, 将含有蛋白溶液的离心管置于液氮中, 快速冷冻 5 min, 使蛋白质溶液完全冻结。将冷冻的离心管取出, 在室温条件下静置 10 min, 使样品完全融化。12 000 r/min, 4 ℃离心 10 min, 取上清与沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析, 观察蛋白质在冻融后上清与沉淀中的分布。

1.3.3 纳米抗体-纳米荧光素酶融合蛋白 G8-Nluc 的可溶性纯化 将收集的菌体平均分为 5 份, 分别使用含有 0.1% Triton X-100、1% Tween-20、20 mmol/L *N*-月桂酰肌氨酸钠 (Sodium *N*-lauroylsarcosinate, SLS)、0.5% NP40 和未添加去垢剂的裂解缓冲液重悬菌体, 按照上述纯化方法在冰浴中超声处理破碎菌体, 离心收集上清液, 并使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分析目标蛋白的溶解情况。在确定 20 mmol/L SLS 可明显促进 G8-Nluc 溶解的基础上, 按照上述纯化方法, 在裂解缓冲液中添加 20 mmol/L SLS 进行 G8-Nluc 的可溶性纯化。

1.3.4 融合蛋白的酶活性分析 将 3 种融合蛋白分别使用 50 mmol/L PBS (pH 6.8) 稀释至 0.1, 1, 10, 50, 100 nmol/L, 以每孔 50 μ L 加入白色酶标板中, 同时以 50 μ L PBS 作为阴性对照。再在每孔加入 50 μ L 底物显色液 (10 mmol/L PBS, 1% NP-10, 2.5 mg/mL BSA, 1 μ mol/L 抗坏血酸, 8.8 mmol/L

EDTA·Na₂, 10 nmol/L CTZ-h, pH 7.4), 使用酶标仪测定其生物发光强度。

1.3.5 BLEIA 方法的建立及特异性分析 用 10 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 配制 5 μ g/mL AFB1-BSA 溶液, 加入 96 孔白色高结合酶标板中, 100 μ L/孔, 4 ℃过夜包被。次日, 使用含有浓度为 0.05% Tween-20 的 PBST 洗板 3 次后, 使用溶于 PBS 的 30 g/L 脱脂奶粉封闭, 300 μ L/孔, 37 ℃反应 1 h。PBST 洗板 5 次, 用含有 20% 甲醇的 PBS 稀释融合蛋白至使用浓度, 将 AFB1 标准品使用含有 20% 甲醇的 PBS 稀释为 100, 75, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1 ng/mL, 50 μ L/孔依次加入酶标板中, 随后加入 50 μ L/孔的融合蛋白, 37 ℃反应 30 min 后, PBST 洗孔板 5 次, 每孔加入 100 μ L 底物显色液, 使用酶标仪检测生物发光强度的变化。

对 BLEIA 方法的特异性进行分析, 与上述 BLEIA 方法流程相似, 将 100 ng/mL 和 10 ng/mL 的不同真菌毒素标准品 (AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、ZEN、DON) 以 50 μ L/孔分别加入酶标板, 以含有 20% 甲醇的 PBS 作为空白对照, 再加入 50 μ L/孔的 Nluc-NB26 融合蛋白, 37 ℃反应 30 min 后, PBST 洗孔板 5 次, 加入 100 μ L/孔底物显色液, 使用酶标仪检测生物发光强度的变化。

1.3.6 实际样品的 BLEIA 和 ELISA 检测 将 1 g 谷物样品研磨成粉末, 取 1 g 前期检测显示不含有 AFB1 的阴性谷物粉末置于离心管中, 添加 AFB1 标准品至终含量为 20, 40, 60 μ g/kg, 以未添加的样品作为阴性对照。使用含有 70% 甲醇的 PBS 缓冲液提取毒素, 将混合物涡旋振荡 15 min 后, 10 000 r/min 离心 15 min, 上清液使用 0.22 μ m 滤膜过滤。将上清液在含有 1 g/L 脱脂奶粉的 PBS 缓冲液中稀释, 并使用上述 BLEIA 方法进行分析。

商业化 ELISA 试剂盒采购自安提生物科技有限公司, 并根据其说明书进行检测。其大体流程如下: 在包被好抗原的酶标板中加入 50 μ L/孔抗 AFB1 的特异性单克隆抗体 (一抗) 和 50 μ L/孔不同浓度的 AFB1 标准品或上述提取样品, 37 ℃孵育 30 min。用洗涤液洗涤孔板 5 次后, 加入 100 μ L/孔 HRP 标记的结合一抗的二级抗体 (1:1 000 稀释度), 并在 37 ℃下再孵育 30 min。用洗涤液洗

涂孔板5次,然后加入100 μL /孔底物显色液,将平板在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min。立即加入50 μL /孔终止液终止反应,并使用酶标仪测定波长450 nm处的吸光度。

2 结果与分析

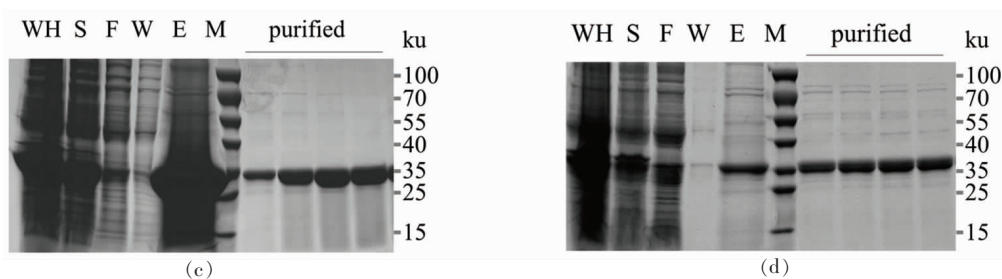
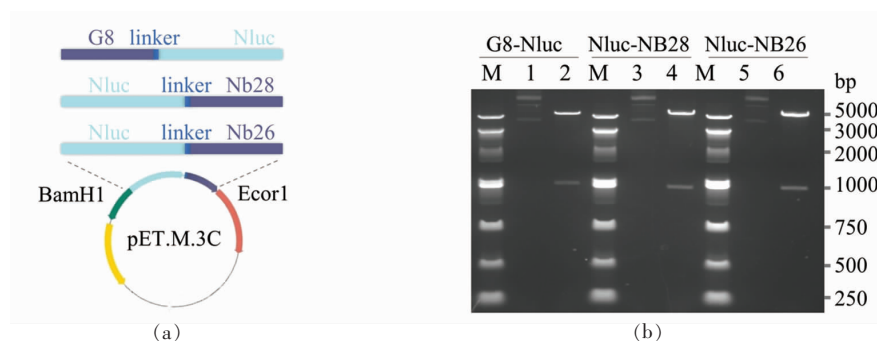
2.1 3种纳米荧光素酶-纳米抗体融合蛋白的表达载体构建与鉴定

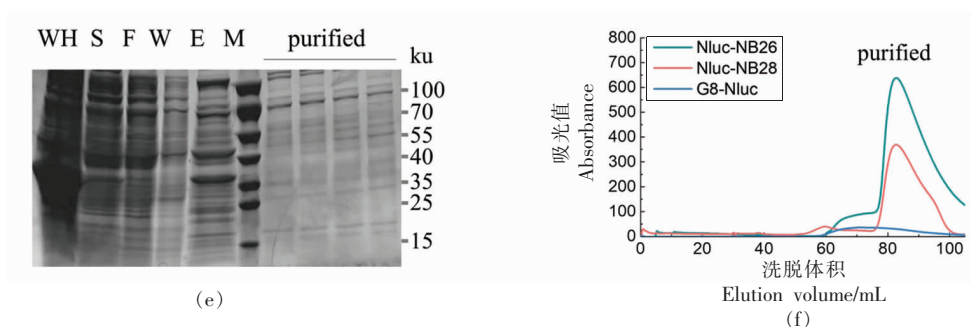
为构建融合蛋白原核表达载体,本研究参考已发表文献获得了3种抗AFB1特异性纳米抗体NB26、NB28和G8以及纳米荧光素酶Nluc的氨基酸序列。如图1a所示,本研究设计了3种纳米抗体与Nluc的融合表达片段,其中G8-Nluc的重组片段与参考文献[23]相同。然后,在*Bam*HI和*Eco*RI两种限制性内切酶的酶切位点处,分别将编码3种融合蛋白的核苷酸序列插入pET.M.3C原核表达载体,从而构建了G8-Nluc、Nluc-NB26和Nluc-NB28 3种融合蛋白的重组质粒。为验证重组质粒构建的正确性,进行质粒的双酶切和琼脂糖凝胶电泳分析。结果显示,重组质粒经酶切后产生的DNA片段与预测的载体和插入片段大小一致(图1b),其中目的片段Nluc-NB26、Nluc-NB28和G8-Nluc的大小分别为957,927,981 bp,证实目的基因已成功插入表达载体。进一步对

重组质粒进行测序,结果证实3种载体均构建正确。

2.2 3种纳米荧光素酶-纳米抗体融合蛋白的表达和纯化分析

在成功构建融合蛋白表达载体的基础上,将3种表达载体分别转化大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞,以测试所编码融合蛋白的表达情况。SDS-PAGE凝胶电泳结果显示,在3种融合蛋白预期的36 ku处,均有明显的条带,表明3种蛋白均有较高水平的表达,而其可溶性差异显著(图1c~1e)。具体分析显示,Nluc-NB26的可溶性表达量最高,大部分蛋白可溶解于上清。Nluc-NB28的可溶性表达量次之,而G8-Nluc主要以不溶性包涵体形式存在,上清中可溶性蛋白的比例很低。采用 Ni^{2+} -NTA亲和层析法成功分离纯化了2种可溶性重组蛋白Nluc-NB26和Nluc-NB28,结果显示其中Nluc-NB26的产量明显高于Nluc-NB28。而对于可溶性较差的G8-Nluc,难以通过亲和层析获得富集。进一步采用排阻色谱法分离获得了高纯度的Nluc-NB26和Nluc-NB28融合蛋白。在相同的条件下,G8-Nluc融合蛋白没有检测到明显的特征峰,收集的样品也未见明确的目标蛋白条带(图1c~1f)。





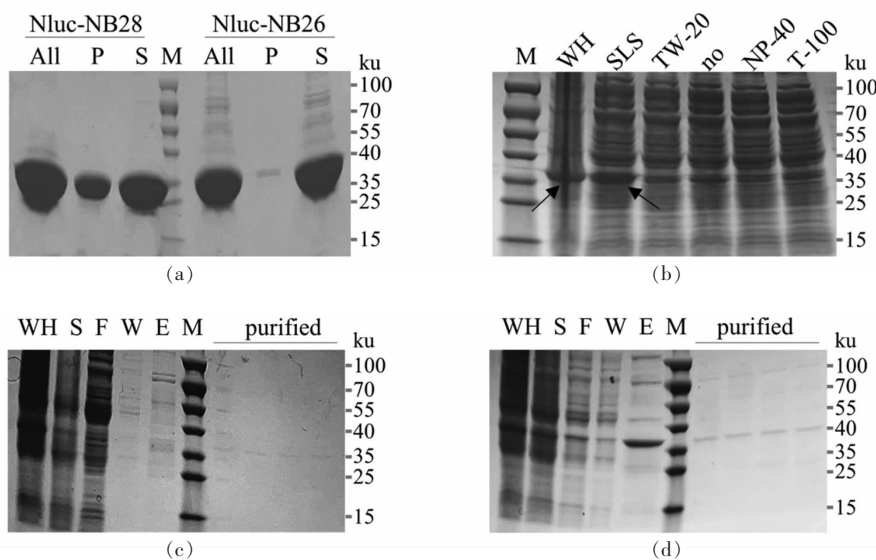
注:(a)重组质粒构建示意图。G8-Nluc、Nluc-NB28 和 Nluc-NB26 重组片段通过酶切位点 *Bam*HI 和 *Eco*RI 插入大肠杆菌表达载体 pET.M.3C。(b)重组质粒的双酶切验证。从左到右分别为 G8-Nluc、Nluc-NB28 和 Nluc-NB26,其中 1,3,5 泳道分别为重组质粒;2,4,6 泳道分别为重组质粒酶切产物;M 泳道为 DNA marker。(c)Nluc-NB26 融合蛋白的表达纯化。(d)Nluc-NB28 融合蛋白的表达纯化。(e)G8-Nluc 融合蛋白的表达纯化。其中 WH、S、F、W、E、M、purified 泳道分别为镍柱亲和层析过程中全细胞、上清液、流出液、洗涤液、洗脱液、蛋白 marker 及排阻色谱进一步纯化得到的样品。(f)3 种融合蛋白的排阻色谱吸收峰图。

图 1 3 种融合蛋白的重组质粒构建及蛋白表达纯化

Fig.1 Construction of recombinant plasmids, expression and purification of three kinds of fusion proteins

除此之外,纯化蛋白过程中发现,Nluc-NB28 在排阻色谱分离时会产生沉淀,因此进一步对比了 Nluc-NB26 和 Nluc-NB28 蛋白的稳定性。将纯化得到的目标蛋白浓缩后使用液氮速冻,然后在室温下解冻,将得到的蛋白溶液离心,并分别取沉淀和上清液样品跑胶^[35]。结果如图 2a 所示,Nluc-NB28 在离心后的沉淀中存在较多的蛋白,其含量

约为总蛋白的 38.9%,而 Nluc-NB26 蛋白基本仍保持在上清中,说明 Nluc-NB28 的稳定性较差,在冻融处理后更易发生聚集沉淀。综合上述结果表明,3 种融合蛋白的可溶性蛋白表达量由高到底依次为 Nluc-NB26、Nluc-NB28、G8-Nluc,其中 Nluc-NB26 相比于 Nluc-NB28 稳定性更好。



注:(a)Nluc-NB28 与 Nluc-NB26 的稳定性测试。All、P 和 S 泳道分别代表纯化后的总蛋白、离心后的沉淀及上清。(b)不同表面活性剂对 G8-Nluc 溶解性的影响。WH 和 SLS、TW-20、no、NP-40、T-100 泳道分别代表全细胞和使用 20 mmol/L SLS、Tween-20、常规、NP-40、Triton X-100 裂解液破碎菌体的上清样品。(c)常规缓冲液纯化 G8-Nluc 的 SDS-PAGE 胶图。(d)含有 20 mmol/L SLS 的裂解液纯化 G8-Nluc 的 SDS-PAGE 胶图。其中 WH、S、F、W、E、M、purified 泳道分别为镍柱亲和层析过程中全细胞、上清液、流出液、洗涤液、洗脱液、蛋白 Marker 及排阻色谱进一步纯化得到的样品。

图 2 Nluc-NB28、Nluc-NB26 的稳定性及 G8-Nluc 的可溶性测试

Fig.2 Stability analysis of Nluc-NB28 and Nluc-NB26, solubility analysis of G8-Nluc

由于 G8-Nluc 融合蛋白的可溶性很差,通过常规纯化方式难以获得,前人研究中使用商业化的包涵体纯化试剂盒进行提纯,得到了少量的可溶性蛋白^[23]。为了建立成本更低的 G8-Nluc 纯化方法,本研究测试了不同表面活性剂(SLS、Triton X-100、Tween 20、NP40)对其可溶性的影响。结果发现加入 20 mmol/L 的 SLS 能够明显提高 G8-Nluc 的可溶性(图 2b)。因此,进一步将同一批表达的 G8-Nluc 菌体等比例分成 2 份,一份使用常规纯化方法,另一份使用含有 20 mmol/L SLS 的缓冲液进行纯化。结果显示在加入 20 mmol/L SLS 后能够得到少量的纯度较高的 G8-Nluc 融合蛋白(图 2c~2d)。上述纯化得到的融合蛋白被用于建

立 AFB1 的免疫分析方法。

2.3 基于 3 种融合蛋白的生物发光酶联免疫分析 BLEIA 体系的建立与比较分析

与采用一抗结合抗原、酶标二抗与之反应后显色的传统 ELISA 方法不同,BLEIA 方法只需一步抗原与纳米荧光素酶-纳米抗体融合蛋白间的反应,然后直接添加底物进行生物发光检测(图 3a~3b),操作更简便高效。因此,在成功表达并纯化上述融合蛋白,并分析了它们的性质后,本研究利用这 3 种蛋白分别建立了检测 AFB1 的 BLEIA 分析体系,并比较不同融合蛋白对检测性能的影响。

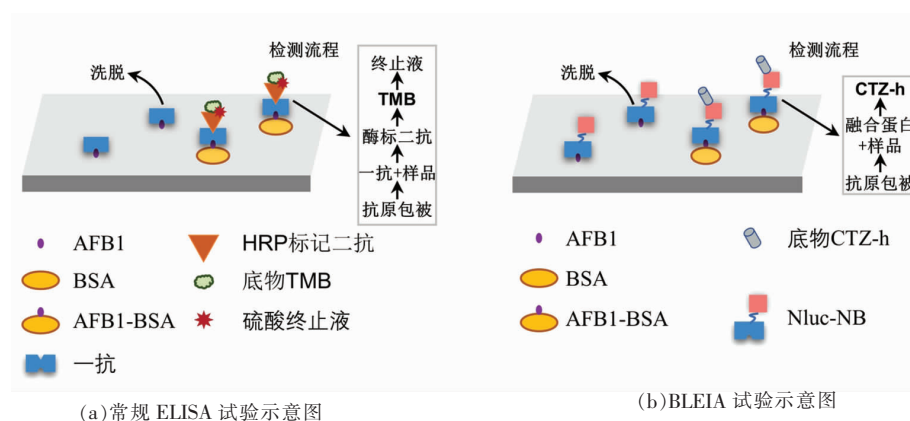


图 3 常规 ELISA 和一步法 BLEIA 试验示意图

Fig.3 Schematic diagrams of conventional ELISA and one-step BLEIA

首先,对 3 种融合蛋白催化底物产生荧光信号的酶活性进行检测,以确定其是否适合用于建立 BLEIA 方法。结果显示,Nluc 在 3 种融合蛋白中的酶活性水平均与单独的 Nluc 相当(图 4a),说明其催化活性未受影响,可以用于构建 BLEIA 方法。为了在较高荧光检测信号条件下比较不同融合蛋白的检测性能,本研究首先用 Nluc-NB26 融合蛋白测试了不同浓度的包被抗原和抗体对 BLEIA 方法检测产生的荧光强度的影响。结果显示,抗原和融合蛋白的浓度升高会提高荧光强度(图 4b 和 4c)。当包被抗原 AFB1-BSA 的质量浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而 3 种融合蛋白的质量浓度在 0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,检测产生的荧光强度均可以达到 10^6 (图 4b 和图 4c),证明 3 种融合蛋白均具有较好的

抗原结合活性,且使用相应的包被抗原和融合蛋白浓度能够产生满足后续定量检测需求的荧光信号。进一步对 Nluc-NB26 融合蛋白的浓度进行测试发现,随着抗体浓度的升高,检测 AFB1 的 IC_{50} 值逐渐增加,检测灵敏度降低(图 4d)。因此,0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的融合蛋白被用于进一步比较基于不同抗体的 BLEIA 体系检测 AFB1 的灵敏度。BLEIA 检测体系的其它参数,如甲醇浓度、pH 值等均参考前人优化得到的试验条件^[23]。

在确定了适宜的抗原和抗体浓度条件后,基于 3 种不同融合蛋白建立了 BLEIA 体系,并采用 AFB1 标准品进行检测,得到了 3 种 BLEIA 体系检测 AFB1 的标准曲线(图 5a~5c)。结果显示,Nluc-NB28-BLEIA、G8-Nluc-BLEIA 和 Nluc-NB26-

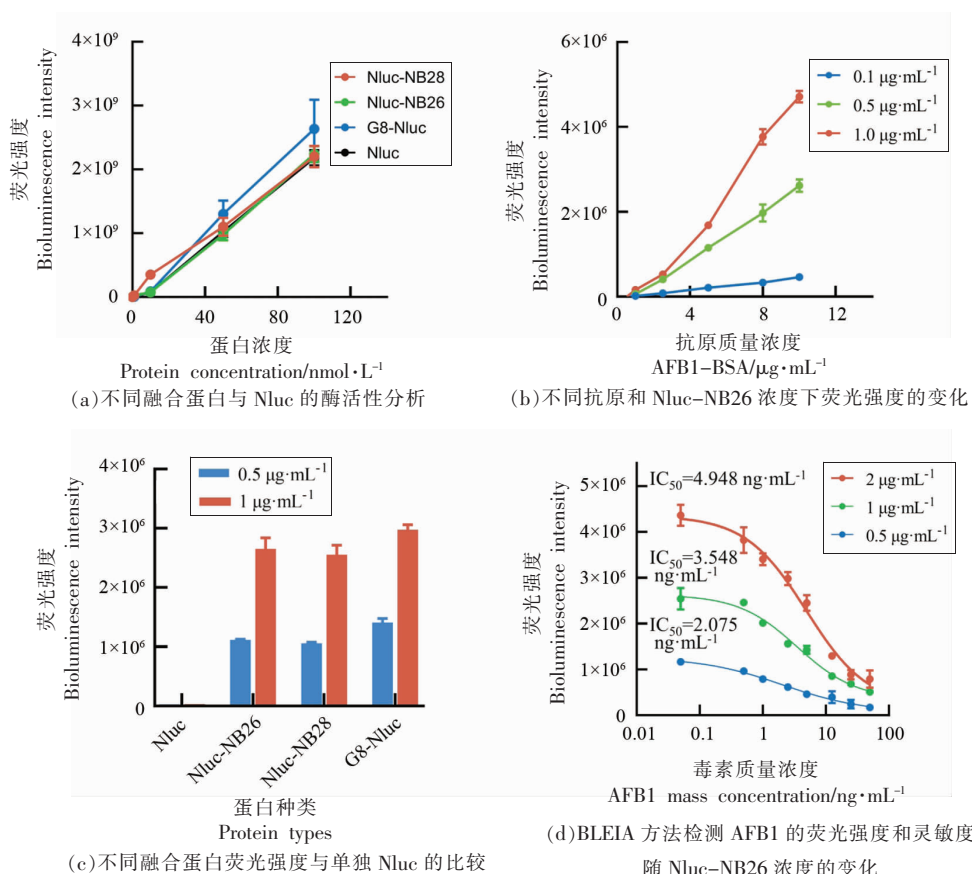


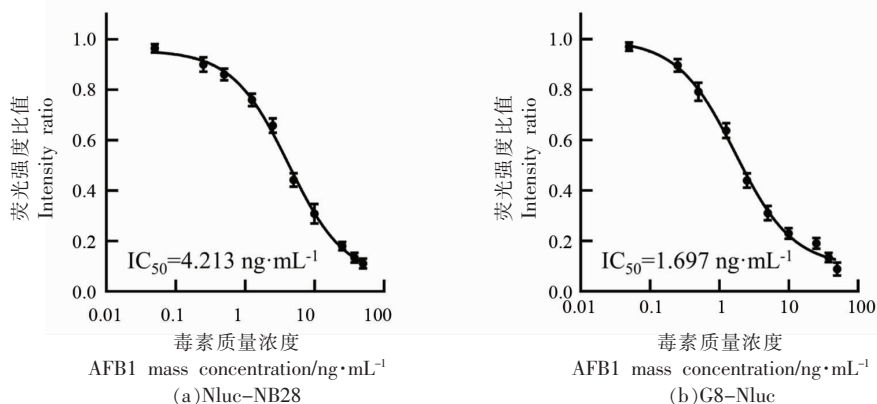
图 4 融合蛋白的酶活测定及 BLEIA 条件优化

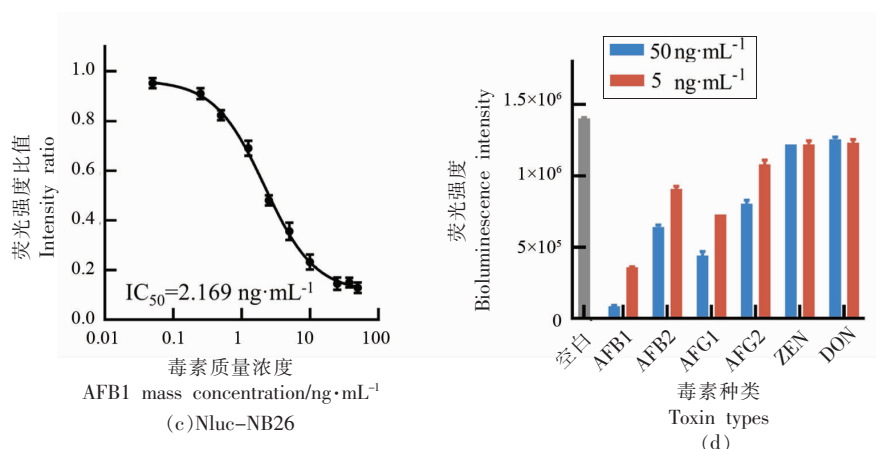
Fig.4 Enzyme activity measurements of fusion proteins and optimization of BLEIA conditions

BLEIA 体系检测 AFB1 的 IC_{50} 值分别为 4.213, 1.697, 2.169 ng/mL; 检测限 IC_{10} 分别为 0.537, 0.205, 0.338 ng/mL; 线性范围 ($IC_{20} \sim IC_{80}$) 分别为 1.149~15.447, 0.447~6.436, 0.671~7.008 ng/mL (图 5a~5c, 表 1)。

这些结果表明 G8-Nluc-BLEIA 体系的检测灵敏度最高, Nluc-NB26-BLEIA 次之, 而差别较

小, 而 Nluc-NB28-BLEIA 的检测效果较差。因此, 综合考虑前期 3 种蛋白可溶性、稳定性测试的结果及 BLEIA 的检测效果, Nluc-NB26-BLEIA 体系的核心元件 Nluc-NB26 融合蛋白获取难度低, 稳定性高, 且检测性能相对较好, 被用于进一步的特异性分析和实际样品检测。





注:(a-c)Nluc-NB28-BLEIA、G8-Nluc-BLEIA、Nluc-NB26-BLEIA 检测 AFB1 的标准曲线。(d)不同真菌毒素对 Nluc-NB26-BLEIA 检测荧光强度的影响。

图 5 BLEIA 方法检测 AFB1 的标准曲线及 Nluc-NB26-BLEIA 检测 AFB1 的特异性分析
Fig.5 The standard curves of BLEIAs for detecting AFB1 and the specificity analysis of Nluc-NB26-BLEIA

表 1 基于 3 种融合蛋白的 BLEIA 体系检测 AFB1 的分析参数

Table 1 Analytical parameters for AFB1 detection in the BLEIA systems using three fusion proteins

融合蛋白	检测限/ng·mL ⁻¹	线性范围/ng·mL ⁻¹	R ²
Nluc-NB28	0.537	1.149~15.447	0.994
G8-Nluc	0.205	0.447~6.436	0.992
Nluc-NB26	0.338	0.671~7.008	0.994

2.4 Nluc-NB26-BLEIA 体系检测 AFB1 的特异性分析

Nluc-NB26-BLEIA 体系检测 AFB1 的特异性进行进一步分析。结果显示,在较高质量浓度(50 ng/mL 和 5 ng/mL)下,AFB1 的结构类似物 AFB2、AFG1 以及 AFG2 会导致一定程度的交叉反应,使荧光强度发生变化,而明显弱于 AFB1 产生的影响(图 5d)。而非特异性的真菌毒素包括玉米赤霉烯酮(ZEN)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)几乎不对荧光强度产生影响。这些结果证明 Nluc-NB26-BLEIA 体系可用于特异性检测 AFB1。

2.5 Nluc-NB26-BLEIA 方法对实际样品中 AFB1 的检测分析

为了评估 Nluc-NB26-BLEIA 方法检测实际样品中 AFB1 的准确性,本研究使用预先通过商业化 ELISA 试剂盒确定不含 AFB1 的谷物样本,并在样品中分别添加了 20,40,60 μg/kg 的 AFB1 标准品。考虑到基质效应可能会对检测产生影响,根据前人研究结果^[29],使用含 0.1%脱脂牛奶的阴

性谷物提取液分别稀释标准品和提取样品,以消除潜在的基质干扰。结果显示,利用 Nluc-NB26-BLEIA 方法对加标小麦样品中 AFB1 检测的批内回收率在 91.1%~104.1%之间,标准偏差在 5.8%~18.1%之间,批间回收率在 95.0%~98.8%之间,标准偏差在 6.1%~13.3%之间;加标玉米样品中 AFB1 检测的回收率在 95.3%~101.1%之间,标准偏差在 5.4%~15.0%之间,批间回收率在 94.5%~98.2%之间,标准偏差在 5.8%~13.2%之间(表 2 和表 3);表明该 BLEIA 方法检测 AFB1 具有良好的准确性。

进一步使用该 BLEIA 方法和商业化 ELISA 试剂盒进行平行检测,以评估 6 份从市场上购买的、在本实验室进行不同程度的黄曲霉菌侵染后的谷物样品。在这 6 份实际样品中,有 3 份被检测到 AFB1,其中 BLEIA 和 ELISA 检测得到的浓度分别为 (2.3±0.4), (1.1±0.1), (3.3±0.2) μg/kg 和 (2.0±0.2), (1.1±0.1), (3.4±0.3) μg/kg(表 4)。两种方法的检测结果基本一致,进一步验证了所建立

表 2 Nluc-NB26-BLEIA 方法检测批内谷物加标样品中 AFB1 的回收率

样品	添加值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	变异系数/%
小麦	20	18.2 ± 3.3	91.1	18.1
	40	36.5 ± 5.3	91.2	9.7
	60	62.4 ± 3.6	104.1	5.8
玉米	20	19.4 ± 1.0	97.1	5.4
	40	40.4 ± 6.1	101.1	15.1
	60	57.2 ± 4.1	95.3	7.2

表 3 Nluc-NB26-BLEIA 方法检测批间谷物加标样品中 AFB1 的回收率

样品	添加值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出值/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	变异系数/%
小麦	20	19.0 ± 1.8	95.0	9.5
	40	38.3 ± 5.1	95.8	13.3
	60	59.3 ± 3.6	98.8	6.1
玉米	20	18.9 ± 1.1	94.5	5.8
	40	38.7 ± 5.1	96.8	13.2
	60	58.9 ± 4.0	98.2	6.8

表 4 Nluc-NB26-BLEIA 和商业化 ELISA 试剂盒检测实际谷物样品中的 AFB1 含量

Table 4 AFB1 content determination in real cereal samples using Nluc-NB26-BLEIA and commercial

编号	ELISA kits	
	BLEIA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	ELISA/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
1	ND	ND
2	2.3 ± 0.4	2.0 ± 0.2
3	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
4	ND	ND
5	ND	ND
6	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.3
时间/h	0.8	2.0

注:ND. 未检测到 AFB1。

的 BLEIA 方法检测 AFB1 的可靠性。此外,由于 BLEIA 方法仅需要一步抗原抗体反应,缩短了 60% 的检测时间(表 4)。同时,统计 2 种方法试剂成本的结果显示 BLEIA 方法的试剂成本仅为购买 ELISA 试剂盒的 17%(表 5),明显降低。

3 结论

本研究首先构建并在大肠杆菌中成功表达了 3 种抗 AFB1 特异性纳米抗体 G8、NB26 和 NB28

表 5 Nluc-NB26-BLEIA 与商业化 ELISA 试剂成本的对比

Table 5 Comparison of costs between Nluc-NB26-BLEIA and commercial ELISA kits

检测类型	试剂类别	成本/元	总成本/元
BLEIA	蛋白表达纯化	9.8	324.7
	酶标板	19.0	
	AFB1-BSA 抗原	57.6	
	脱脂奶粉	0.1	
	PBST 缓冲液	0.2	
	甲醇	0.2	
	AFB1 标准品	60.8	
	荧光素酶底物缓冲液	177.0	
ELISA	商业化试剂盒	1 900.0	1 900.0

注:成本按照 1 块 96 孔酶标板,每板测定 3 次标准曲线所需的试剂进行估算。

与纳米荧光素酶 Nluc 的融合蛋白。蛋白表达和纯化的结果显示,这 3 种融合蛋白在大肠杆菌中的表达量较高,然而其可溶性与稳定性存在明显的差异,其中 Nluc-NB26 可溶性表达量最高,稳定性更好,Nluc-NB28 的可溶性表达量次之,而 G8-Nluc 基本不可溶,难以通过常规方法有效纯化。这一结果与文献报道 3 种纳米抗体或融合蛋白的可

溶性特征一致,即单独的 NB26 和 NB28 可以通过常规纯化方法得到高纯度蛋白,而 G8-Nluc 需要使用含有表面活性剂的细菌蛋白质提取试剂盒进行纯化,以提高其可溶性^[23,30]。为克服 G8-Nluc 可溶性表达和纯化的困难,本研究筛选了多种非离子表面活性剂,包括 Tween 20、Triton X-100、NP40 及 SLS 等,以探索有效改善 G8-Nluc 可溶性的方法。结果发现添加 SLS 可以有效提高 G8-Nluc 的可溶性,并纯化得到了较高纯度的 G8-Nluc 融合蛋白,为纯化可溶性较低的纳米抗体提供参考。

在优化了纯化条件后,本研究获得了较高纯度的 3 种融合蛋白,并基于这 3 种融合蛋白分别建立了 AFB1 的 BLEIA 检测体系。结果显示,G8-Nluc-BLEIA 体系检测的 IC₅₀ 值最低,这可能是由于 G8 与 AFB1 的亲合力强于 NB26 和 NB28,从而使其检测的灵敏度最高。尽管 Nluc-NB26-BLEIA 体系的检测灵敏度略低于 G8-Nluc-BLEIA,然而 Nluc-NB26 在蛋白表达、纯化和稳定性方面均具有明显优势,因此,被选择用于进一步的特异性分析、谷物样品分析和验证。

Nluc-NB26-BLEIA 体系检测的特异性分析结果显示,AFB1 的类似物 AFB2、AFG1 和 AFG2 在较高浓度下虽然会产生轻微的交叉反应,但远小于 AFB1 对检测的影响,表明 Nluc-NB26-BLEIA 体系检测 AFB1 具有高特异性。这与采用 NB26 纳米抗体建立的其它 AFB1 检测方法,如 ELISA、BA-ELISA 等的结果一致^[30,32]。实际样品的检测结果显示,该 BLEIA 体系检测 AFB1 的回收率在 91.1%~104.1%之间,具有良好的准确性。在与商业化 ELISA 试剂盒的比较分析中,Nluc-NB26-BLEIA 方法展现出与其它一步酶联免疫分析方法类似的优势,即操作简便、快速。这一方法相比于商业化 ELISA 检测时间缩短 60%,检测试剂的成本降至 17%,从而明显降低了整体检测成本。这些优点使 Nluc-NB26-BLEIA 成为 AFB1 大规模筛查的一个快速、低成本、高灵敏的新选择,具有很好的应用前景。

本研究结果表明不同纳米抗体在序列、结构以及毒素分子的结合能力方面的差异可能导致检测性能的差异。前人研究也证明了通过结构引导

的突变设计方法能够提高 NB28 纳米抗体对 AFB1 检测的灵敏度^[31]。因此,深入解析不同抗体与毒素分子的结合机制,以指导纳米抗体突变体的理性设计,从而获得蛋白表达、稳定性及检测效果更好的纳米抗体,是未来研究的重点方向。

参 考 文 献

- [1] KHAN R, GHAZALI F M, MAHYUDIN N A, et al. Aflatoxin biosynthesis, genetic regulation, toxicity, and control strategies: A review[J]. *Journal of Fungi (Basel)*, 2021, 7(8): 606.
- [2] CACERES I, KHOURY A A, KHOURY R E, et al. Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(3): 150.
- [3] LIU S Q, JIANG S X, YAO Z L, et al. Aflatoxin detection technologies: Recent advances and future prospects[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(33): 79627-79653.
- [4] PANTANO L, LA SCALA L, OLIBRIO F, et al. QuEChERS LC-MS/MS screening method for mycotoxin detection in cereal products and spices[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(7): 3774.
- [5] ZUO J S, YAN T T, TANG X Q, et al. Dual-modal immunosensor made with the multifunction nanobody for fluorescent/colorimetric sensitive detection of aflatoxin B1 in maize[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2023, 15(2): 2771-2780.
- [6] SHUIB N S, MAKAHLEH A, SALHIMI S M, et al. Determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-fluorescence with post column photochemical derivatization[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1510: 51-56.
- [7] TRIPATHI P, UPADHYAY N, NARA S. Recent advancements in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 58(10): 1715-1734.
- [8] NUALKAW K, POAPOLATHEP S, ZHANG Z, et al. Simultaneous determination of multiple mycotoxins in swine, poultry and dairy feeds using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(4): 253.

- [9] ALAMERI M M, KONG A S, ALJAAFARI M N, et al. Aflatoxin contamination: An overview on health issues, detection and management strategies [J]. *Toxins (Basel)*, 2023, 15(4): 246.
- [10] KNOPP D. Immunoassay development for environmental analysis [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 385(3): 425-427.
- [11] LIU Y L, GUO Z Y. Novel bioluminescent binding assays for interaction studies of protein/peptide hormones with their receptors[J]. *Amino Acids*, 2016, 48(5): 1151-1160.
- [12] BURBELO P D, JI Y M, IADAROLA M J. Advancing luciferase-based antibody immunoassays to next-generation mix and read testing[J]. *Biosensors (Basel)*, 2023, 13(3): 303.
- [13] 翟艳芳, 岳锋, 王选年. 纳米抗体技术及其在食品安全检测中的应用[J]. *广东农业科学*, 2020, 47(5): 112-118.
- ZHAI Y F, YUE F, WANG X N. Nanobody technology and its application in food safety detection[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(5): 112-118.
- [14] 吴绍文, 邹新路, 胥锦涛, 等. 纳米抗体在真菌毒素检测中的应用[J]. *广东农业科学*, 2022, 49(11): 9-20.
- WU S W, ZOU X L, XU J T, et al. Applications of nanobodies in mycotoxin detection[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(11): 9-20.
- [15] MUYLDERMANS S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2013, 82: 775-797.
- [16] IWAKI T, HARA K, UMEMURA K. Nanobody production can be simplified by direct secretion from *Escherichia coli*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 170: 105607.
- [17] MUYLDERMANS S, BARAL T N, RETAMOZZO V C, et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, 128(1/2/3): 178-183.
- [18] SU B C, ZHANG Z, SUN Z C, et al. Fluonanobody-based nanosensor via fluorescence resonance energy transfer for ultrasensitive detection of ochratoxin A [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422: 126838.
- [19] LI J Z, GUO Z L, SATO T, et al. Optimized application of the secreted Nano-luciferase reporter system using an affinity purification strategy[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196617.
- [20] SHIFERA A S, HARDIN J A. Factors modulating expression of Renilla luciferase from control plasmids used in luciferase reporter gene assays[J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 396(2): 167-172.
- [21] HALL M P, UNCH J, BINKOWSKI B F, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate [J]. *ACS Chemical Biology*, 2012, 7(11): 1848-1857.
- [22] LI Y, LI Y Q, ZHAO J L, et al. Development of a sensitive luciferase-based sandwich ELISA system for the detection of human extracellular matrix 1 protein[J]. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 2016, 35(6): 273-279.
- [23] REN W J, LI Z F, XU Y, et al. One-step ultra-sensitive bioluminescent enzyme immunoassay based on nanobody/nanoluciferase fusion for detection of aflatoxin B1 in cereal[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(18): 5221-5229.
- [24] BAO K L, LIU X, LIAO Y J, et al. Nanobody-nanoluciferase fusion protein-enabled immunoassay for ochratoxin A in coffee with enhanced specificity and sensitivity[J]. *Toxins (Basel)*, 2022, 14(10): 713.
- [25] WANG F, LI Z F, WAN D B, et al. Enhanced non-toxic immunodetection of alternaria mycotoxin tenuazonic acid based on ferritin-displayed anti-idiotypic nanobody-nanoluciferase multimers[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(16): 4911-4917.
- [26] WANG F, LI Z F, YANG Y Y, et al. Chemiluminescent enzyme immunoassay and bioluminescent enzyme immunoassay for tenuazonic acid mycotoxin by exploitation of nanobody and nanobody-nanoluciferase fusion[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(17): 11935-11942.
- [27] VAN DEN BOR J, BERGKAMP N D, ANBUHL S M, et al. NanoB² to monitor interactions of ligands with membrane proteins by combining nanobodies and NanoBRET[J]. *Cell Reports Methods*, 2023, 3(3): 100422.
- [28] YU S, LI Z F, LI J Z, et al. Generation of dual functional nanobody-nanoluciferase fusion and its potential in bioluminescence enzyme immunoassay for trace glypican-3 in serum[J]. *Sensors and Actua-*

- tors B Chemical, 2021, 336: 129717.
- [29] XIE X X, HE Z Y, QU C S, et al. Nanobody/NanoBiT system-mediated bioluminescence immunosensor for one-step homogeneous detection of trace ochratoxin A in food[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 437: 129435.
- [30] HE T, WANG Y R, LI P W, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(17): 8873–8880.
- [31] HE T, NIE Y, YAN T T, et al. Enhancing the detection sensitivity of nanobody against aflatoxin B1 through structure-guided modification[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 188–197.
- [32] YAN T T, ZHU J, LI Y, et al. Development of a biotinylated nanobody for sensitive detection of aflatoxin B1 in cereal via ELISA [J]. *Talanta*, 2022, 239: 123125.
- [33] 曹冬梅, 许杨, 涂追, 等. 基于纳米抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的一步酶联免疫吸附分析法检测黄曲霉毒素 B1[J]. *分析化学*, 2016, 44(7): 1085–1091.
- CAO D M, XU Y, TU Z, et al. One-step enzyme linked immunosorbent assay for detection of aflatoxin B1 using a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(7): 1085–1091.
- [34] 曹冬梅, 许杨, 涂追, 等. 抗黄曲霉毒素 B1 纳米抗体的原核表达、纯化及活性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(5): 19–24.
- CAO D M, XU Y, TU Z, et al. Prokaryotic expression, purification and bioactivity analysis of nanobody against AFB1 [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(5): 19–24.
- [35] BHATNAGAR B, BOGNER R, PIKAL M. Protein stability during freezing: Separation of stresses and mechanisms of protein stabilization[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2007, 12(5): 505–523.

Development of the Detection Method for Aflatoxin B1 Based on Nanobody-Nano Luciferase Fusion Proteins

Chen Wenxing^{1,2}, Wang Fenghua^{1,2}, Tan Xiaoliang², Yan Shijuan², Zhang Jun^{1*}, Wu Shaowen^{2*}
(¹College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070

²State Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry, Guangdong Provincial Key Laboratory for Crop Germplasm Resources Preservation and Utilization, Agro-biological Gene Research Center, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract Aflatoxin B1 (AFB1) is a highly toxic and carcinogenic foodborne contaminant that seriously threatens food safety and public health. To develop a rapid bioluminescent enzyme immunoassay (BLEIA) for detecting AFB1, this study systematically evaluated the soluble expression, purification, and enzymatic activity of three anti-AFB1 nanobody-nano luciferase fusion proteins (G8-Nluc, Nluc-NB26, and Nluc-NB28). Based on the three fusion proteins, BLEIA assays were established, and Nluc-NB26 was selected for the analysis and validation of cereal samples. The results indicated that Nluc-NB26 exhibited the highest soluble expression level and better stability, followed by Nluc-NB28, while G8-Nluc was largely insoluble. Testing with various surfactants revealed that adding sodium lauroyl sarcosinate improved the solubility of G8-Nluc significantly. The purified fusion proteins all exhibited suitable enzymatic and antigen-binding activities. BLEIA results based on the fusion proteins showed the IC₅₀ values for detecting AFB1 were 4.213, 1.697 and 2.169 ng/mL for the Nluc-NB28-BLEIA, G8-Nluc-BLEIA and Nluc-NB26-BLEIA systems, indicating that G8-Nluc-BLEIA had the highest sensitivity, comparable to Nluc-NB26-BLEIA, while Nluc-NB28-BLEIA had the lowest. Considering the soluble expression level, stability, and detection performance of the fusion proteins, Nluc-NB26-BLEIA was further applied to analyze and validate cereal samples. The results demonstrated that this method achieved average recovery rates of 91.1% to 104.1%, comparable to commercial ELISA kits, but with significantly reduced detection time and reagent cost. These findings offer valuable insights for developing rapid and highly sensitive detection techniques for AFB1.

Keywords aflatoxin B1; nanobody; nano-luciferase; rapid detection; bioluminescent enzyme immunoassay