

玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇双特异性抗体的制备及检测方法构建

王云云¹, 石广革², 孙嘉笛¹, 陆欣¹, 纪剑¹, 孙秀兰^{*1,2}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 菏泽市食品药品检验检测研究院, 山东 菏泽 274000)

摘要: 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是粮食中常见的真菌毒素,长期的饮食暴露会对生物体造成严重危害。目前针对ZEN和DON同步免疫检测分别依赖各自对应的单克隆抗体,而传统单克隆抗体制备周期长、成本高。作者利用重组抗体表达技术在短时间内获得了可同时识别ZEN和DON的双特异性抗体(Bis-scFv),并构建了基于Bis-scFv的间接竞争酶联免疫检测方法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, IC-ELISA),获得ZEN和DON标准曲线的半数抑制质量浓度(IC₅₀)分别为20.64 ng/mL和132.29 ng/mL; Bis-scFv具有良好的特异性,与其他真菌毒素均无显著的交叉反应。同时,将IC-ELISA方法对玉米中的ZEN和DON进行加标回收实验,其回收率为86.02%~108.14%。本研究证明了所开发的Bis-scFv未来可应用于粮食样本中ZEN与DON的同步快速检测方法的开发。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 双特异性抗体; 免疫检测

中图分类号: TS 207.3 文章编号: 1673-1689(2023)11-0001-10 DOI: 10.12441/spyswjs.20230317002

Preparation of Bispecific Antibodies Against Zearalenone and Deoxynivalenol and Construction of Detection Methods

WANG Yunyun¹, SHI Guangge², SUN Jiadi¹, LU Xin¹, JI Jian¹, SUN Xiulan^{*1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Heze Food and Drug Inspection and Testing Institute, Heze 274000, China)

Abstract: Zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON) are common mycotoxins found in grain, and long-term dietary exposure can cause serious harm to organisms. Currently, simultaneous immunoassays for ZEN and DON mostly rely on their respective monoclonal antibodies. However, the preparation of traditional monoclonal antibodies requires long production cycles and high costs. In this study, bispecific antibodies (Bis-scFv) that could simultaneously recognize both ZEN and DON were obtained in a short time using recombinant antibody expression technology. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA) based on Bis-scFv was established. The half-maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) for ZEN and DON standard curves was determined to be 20.64 ng/mL and 132.29 ng/mL, respectively. Bis-scFv exhibited excellent specificity with no

收稿日期: 2023-03-17 修回日期: 2023-04-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(YFA20210910203)。

* 通信作者: 孙秀兰(1976—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品安全与质量研究。E-mail: sxlzzz@jiangnan.edu.cn

significant cross-reactivity with other mycotoxins. Moreover, IC-ELISA was used to conduct spike recovery experiments for ZEN and DON in corn, yielding recovery rates ranging from 86.02% to 108.14%. The study demonstrates that the developed Bis-scFv has the potential for future application in the development of synchronous and rapid detection of ZEN and DON in grain samples.

Keywords: zearalenone, deoxynivalenol, bispecific antibody, immunoassay

真菌毒素是一类由曲霉菌、镰刀菌、青霉菌等丝状真菌产生的次生代谢产物。常见的真菌毒素如赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮(ZEN)、黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和伏马菌素,可通过日常饮食被生物体摄入并在体内累积,对生物体的肝肾功能、生殖系统、免疫功能等造成不可逆的伤害^[1-2]。2013—2014年,Han等对麦麸在内的357个饲料样本的真菌毒素污染情况调查显示,DON是中国饲料中最常见的真菌毒素,其次是ZEN和AFB₁^[3]。2019年,Yang等对国内市场上的576个玉米制品中的真菌毒素污染水平进行评估^[4],结果表明78%的样品至少存在一种真菌毒素污染,其中DON和ZEN的发生率分别为63%和46%。可见,DON和ZEN广泛存在于粮食以及饲料中,对粮食中ZEN和DON开展同步快速检测对保障粮食安全具有重要意义。

目前针对DON和ZEN的检测手段主要包括仪器检测分析法和免疫分析法两大类^[5-7]。气相色谱、液相色谱、气相色谱质谱联用等大型仪器法可以实现高精度检测,但同时复杂的样品处理流程使其无法实现现场检测^[8]。免疫检测方法是一种基于抗原抗体特异性结合的检测手段。相对于色谱和质谱方法,免疫检测方法对操作人员和场地要求低,且能够实现低成本、快速灵敏检测污染物^[9]。目前,通过动物免疫获得的多克隆或单克隆抗体是免疫检测中使用的主要识别元件。其中多克隆抗体特异性差,检测背景信号值高,不适于真菌毒素的精准定量;单克隆抗体的特异性强,批间差异小,但技术要求高、制备周期长、成本高且只能检测一类具有类似结构的真菌毒素。因此,特异性抗体的高效制备是免疫检测方法开发的关键因素。

近年来,基因重组抗体技术发展迅速。该技术将含有抗体基因的载体导入到原核或真核生物中,在一定条件下培养可诱导产生具有生物活性的蛋白质。重组抗体克服了传统抗体生产的局限性,无须经过复杂的细胞融合筛选过程,具有生产周期短、重复性好的优点。相比传统的杂交-杂交瘤融合

技术,重组表达的双特异性抗体无须经过多次细胞融合筛选的过程,且不易发生由染色体丢失造成的生产能力丧失的情况。目前双特异性抗体类型有区内交换抗原结合片段、抗原结合片段-单链抗体、单链抗体-单链抗体(scFv)₂等^[10]。其中(scFv)₂形式可以通过多肽连接臂连接2种scFv,具有结构简单、相对分子质量低且不存在错误组装、表达效率高等优势^[11]。因此,作者首先在哺乳动物细胞Expi293F中表达了ZEN单链抗体(ZEN-scFv)和DON单链抗体(DON-scFv),进一步设计和制备可识别ZEN和DON的双特异性抗体(Bis-scFv)并建立酶联免疫检测方法。表达抗体Bis-scFv制备周期短、重现性好和可定向改造,有助于提高抗体制备效率,实现多种物质同时检测,具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 菌株与细胞 大肠杆菌(*E. coli* DH5 α)感受态:天根生化科技有限公司(北京);Expi293F细胞:赛默飞世尔科技有限公司(美国);表达质粒构建、引物合成和基因测序由安升达生物科技有限公司(苏州)完成。

1.1.2 主要试剂 玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、黄曲霉毒素B₁(AFB₁)、赭曲霉毒素A(OTA)和T-2毒素等标准品:Sigma-Aldrich公司;ExpiFectamine293转染试剂盒、Opti-MEM I无血清培养基、Expi293F表达培养基、Gene Ruler DNA Ladder Mix:赛默飞世尔科技有限公司(美国);卵清蛋白(Ovalbumin,OVA)、无缝克隆试剂盒、氨苄青霉素(Amp):生工生物工程有限公司(上海);PCR Master Mix高保真酶:翌圣生物科技股份有限公司(上海);辣根过氧化物酶标记抗His标签单克隆抗体:ImmunoWay生物技术公司;His标签蛋白纯化试剂盒、预染蛋白质Marker:碧云天生物技术公司(南通);牛血清蛋白(Bovine albumin,BSA):国药集团化学试剂有限公司(上海)。

1.1.3 实验仪器 T-100 链式反应核酸扩增仪、Mini-PROTEAN Tetra1658033 蛋白质电泳系统: Biorad 公司(上海);Thermo3111 恒温培养箱:赛默飞世尔科技有限公司(美国);VS-1300L-U 超净工作台:安泰空气技术有限公司(苏州)。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒设计 抗体由两组轻链(VL、CL)和重链(VH、CH₁、CH₂ 和 CH₃)组成,结构呈现“Y”型,见图 1(a)。抗体的可变区负责识别结合抗原,可变区的 VH 和 VL 可通过长度通常为 10~25 个氨基酸残基的多肽接头连接形成 scFv,见图 1(b)。其作为小相对分子质量的单个多肽更容易被改造和表达,并且能够保留原始抗体的性质^[12]。作者首先构建了 ZEN-scFv 和 DON-scFv 重组质粒,并在哺乳动物细胞 Expi293F 中表达。通过柔性连接子 (Gly₄Ser)₃ 将 ZEN-scFv 和 DON-scFv 基因序列连接用于融合表达,获得双特异性抗体 Bis-scFv,见图 1(c),以期可以同时结合 ZEN 和 DON 这 2 种不同的表位。为促进重组抗体通过 Expi293F 细胞进行高表达分泌,在 DON-scFv、ZEN-scFv、Bis-scFv 前添加信号肽(SP),信号肽序列为:MGWSCILFLVATATGVHS^[13-14]。DON-scFv 和 ZEN-scFv 基因序列来自 NCBI 数据库,DON-scFv NCBI:AY151141.1,AY151140.1;ZEN-scFv NCBI:U74672.1,U74671.1。

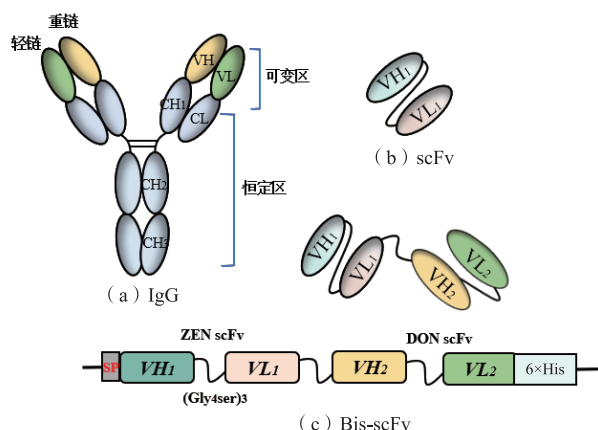


图 1 重组抗体质粒设计

Fig. 1 Design of recombinant antibody plasmid

1.2.2 重组载体构建 双特异性抗体表达载体构建采用无缝克隆技术,构建流程见图 2,构建过程使用的引物见表 1。*CH-Linker-DON-scFv-pTT5* 载体由金斯瑞生物科技股份有限公司构建,保存于作者

所在实验室。*Bis-scFv-pTT5* 重组载体的构建采用无缝克隆技术,将 *CH-Linker-DON-scFv-pTT5* 载体中的 *CH* 基因替换成 *ZEN-scFv*。以 *ZEN-scFv-pCMV* 为模板,以 *BIS-SCFV-F1/F2* 为引物,经过 PCR 扩增获得 *ZEN-scFv* 片段 (802 bp)。以 *CH-Linker-DON-scFv-pTT5* 载体作为模板,以 *BIS-SCFV-V1/V2* 为引物对经 PCR 扩增获得 *Linker-DON-scFv-pTT5* 载体片段 (5 227 bp)。利用无缝克隆酶连接上述的 PCR 纯化产物,取 100 ng *Linker-DON-scFv-pTT5* 的 PCR 产物和 40 ng *ZEN-scFv* 扩增片段,两者之间的摩尔比保持在 1:2~1:3,加入 10 μ L 的 2 \times 无缝克隆酶混合液,用无菌水补足体系至 20 μ L。混合物置于 50 $^{\circ}$ C 水浴下反应 40 min,立即冰浴冷却 2 min 后进行热激转化 (42 $^{\circ}$ C、90 s)。转化后的 *E. coli* DH5 α 进行菌落 PCR 验证,经琼脂糖凝胶电泳验证,将长度正确的菌株接种到含有氨苄的 LB 培养基中培养 6 h,用于测序。相同操作进行 *DON-scFv-pCMV* 重组载体构建。

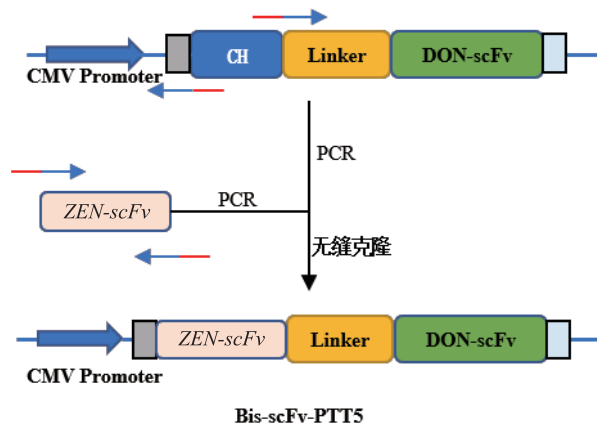


图 2 *Bis-scFv-pTT5* 构建流程

Fig. 2 Construction process of *Bis-scFv-pTT5*

1.2.3 哺乳动物细胞表达重组抗体 Expi293F 细胞的培养和转染遵循 Vazquez-Lombardi 的实验方案^[14]。首先将液氮保存的 10⁷ 个 Expi293F 细胞加入 25 mL 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 含体积分数 8.0% 的 CO₂ 条件下培养并传代 3~4 代。取 7.5 \times 10⁷ 个细胞置于 25.5 mL 培养基中,并向其中加入表达抗体质粒和阳离子脂质体转染试剂继续培养,18 h 后再加入增强剂 I 和增强剂 II 以维持细胞活性,继续培养 7 d,将培养物以 3 200 r/min 离心 20 min,上清液用于纯化。

1.2.4 表达产物纯化以及聚丙烯酰胺蛋白质电泳验证 向 3 mL 柱体积的层析亲和柱中加入 1 mL 的

表 1 质粒构建所用引物

Table 1 Primers used in plasmid construction

引物名称	引物 DNA 序列 5'-3'
BIS-SCFV-V1	AGACCAACCCATGAATTCGCTAGAGATCCG
BIS-SCFV-V2	GAGATCAAGGGCGGGGCGGCAG
BIS-SCFV-F1	CCCGCCCTTGATCTCCAGCTTGCTG
BIS-SCFV-F2	GCGAATTCATGGGTTGGTCTTGTATCATACTGT
PTT-1	ACTTCTGCGCTAAGATTGTCAG
PTT-2	CGAGTGAGAGACACAAAAATTCCAA
DON-scFv-F1	TCACTCCATGGCCCAAGTGCAAC
DON-scFv-F2	ACCGAATTCTCACTGGTGATGGTGATGGTGG
DON-scFv-V1	TGGGCCATGGAGTGAACGCCTG
DON-scFv-V2	ACCACTGAGAATTCGGTCGACCGAGA
pCMV-F	GCAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGA
pCMV-R	GCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAG

Ni-TAN 凝胶, 加入 1 mL 的非变性裂解液平衡 2~3 次。将待纯化的上清液加入亲和柱中, 富集分离目的蛋白质。加入 1 mL 的洗涤液(含 20 mmol/L 咪唑)洗涤 3 次, 去除多余的杂蛋白质。加入 1 mL 的洗脱液(含 250 mmol/L 咪唑), 重复洗脱 6 次, 收集洗脱液。纯化产物用 12.5 g/dL 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证相对分子质量大小。为保护抗体的活性, 对上述的洗脱产物用 PBS 缓冲溶液(0.01 mol/L, pH 7.4)透析 3 d, 去除杂质离子。

1.2.5 抗体亲和性验证 抗体亲和性采用 ELISA 法测定。步骤如下:

1)包板 向 96 孔板加入 100 μ L 质量浓度为 1 μ g/mL 的 DON 或 ZEN 抗原, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 然后用 PBST (含有体积分数 0.05% 吐温-20 的 PBS 溶液)洗涤 5 次。

2)封闭 PBST 洗涤后, 每孔加入 250 μ L 含有 5 g/dL 脱脂奶粉 PBS 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h, 结束后再将 96 孔板用 PBST 洗涤 5 次并干燥。

3)加样 取 100 μ L 纯化抗体、50 μ L 纯化抗体与 50 μ L 不同质量浓度的毒素标准品的混合液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBST 洗涤 5 次。

4)加二抗 将 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗 His 标签二抗加入孔中, 并在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min, PBST 洗涤 5 次。

5)显色读数 向每个样品孔中加入 100 μ L 的

3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液, 15 min 后加入 50 μ L 浓度为 2 mol/L 的 H_2SO_4 溶液终止显色反应, 测定 OD_{450} 。添加体积分数 10% 甲醇的 PBS 溶液到对照孔, 其 OD_{450} 为 B_0 , 添加 DON 和 ZEN 标准品的 OD_{450} 为 B 。以毒素质量浓度为横坐标, B/B_0 为纵坐标, 用 origin 2018 软件通过非线性拟合得到标准曲线, 并确定 B/B_0 为 50% 时所对应的真菌毒素的质量浓度, 即半抑制质量浓度 (IC_{50})。此外, 通过对比相同质量浓度下的 ZEN、DON、OTA、AFB1、T-2 毒素对于抗体与抗原结合的抑制效果, 验证抗体的特异性。对各组抑制率采用 graphpad prism8.0.1 单因素方差 (ANOVA) 分析, 不同字母标记 (a/b) 表示 2 组差异显著性 ($P < 0.05$)。

1.2.6 实际样品检测 取 5 g 玉米粉, 添加质量分数为 40、80 μ g/kg 的 ZEN 标准品充分混匀, 用 20 mL 甲醇-水 (体积比 86:14) 超声提取 30 min。将提取物于 12 000 r/min 离心 15 min, 并用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后用氮气干燥。将其重新溶解于 1 mL 体积分数 10% 的甲醇 PBS 中, 提取物用体积分数 10% 的甲醇 PBS 稀释 20 倍用于 ELISA 检测。相同步骤对玉米进行 DON 加标分析, 加标的质量分数分别为 80 μ g/kg 和 240 μ g/kg。

$$CV(\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

$$RSD(\%) = \frac{SD}{m_3} \times 100\%$$

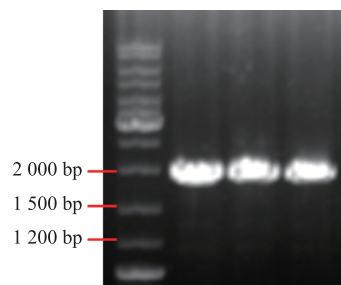
式中: CV 为加标回收率, %; m_1 为玉米粉中 ZEN 质

量分数的测定值, $\mu\text{g}/\text{kg}$; m_2 为玉米粉中实际 ZEN 加标的质量分数, $\mu\text{g}/\text{kg}$; RSD 为相对标准偏差, %; SD 为玉米粉中 ZEN 质量分数测定值的标准偏差, $\mu\text{g}/\text{kg}$; m_3 为玉米粉中 ZEN 质量分数测定值的平均值, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

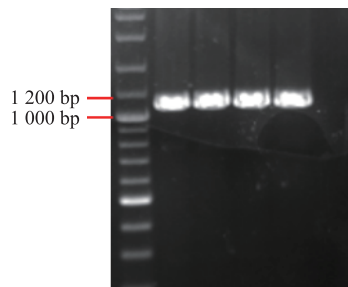
2 结果与分析

2.1 重组载体的构建

重组载体 Bis-scFv-pTT5 和 DON-scFv-pCMV 的琼脂糖凝胶电泳验证结果见图 3。Bis-scFv-pTT5 其扩增片段大小位于 2 000 bp 附近, 见图 3(a), 符合理论值 1 904 bp。DON-scFv-pCMV 其扩增片段大小位于 1 000~1 200 bp, 见图 3(b), 符合理论值 1 075 bp。对菌落 PCR 长度验证正确的菌株进行碱基测序显示, 重组载体片段正确组装, 且碱基序列正确, 未发生基因突变, 表明 Bis-scFv-pTT5 和 DON-scFv-pCMV 重组载体构建成功。



(a) Bis-scFv-pTT5载体验证结果



(b) DON-scFv-pCMV载体验证结果

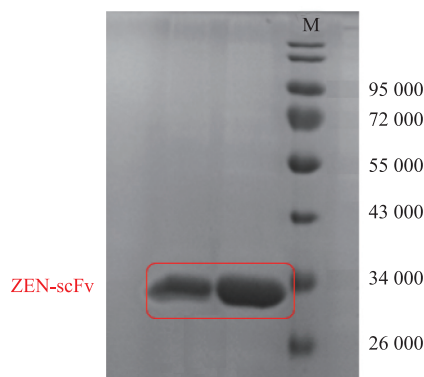
图 3 重组载体琼脂糖凝胶电泳验证图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant antibody plasmids

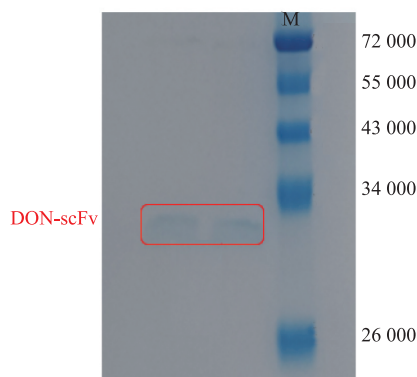
2.2 ZEN-scFv 和 DON-scFv 的 SDS-PAGE 分析

Expi293F 细胞采用了 30 mL 的体系, 诱导表达后离心去除细胞, 对上清液进行纯化, 分别收获 1.55 mg ZEN-scFv 和 253 μg 的 DON-scFv, SDS-PAGE 验证结果见图 4。ZEN-scFv 含有 251 个氨基酸, 通过 SnapGene 软件计算蛋白质理论相对分子质量为 26 700, 在 26 000~34 000 条带单一, 见图 4

(a), 符合 ZEN-scFv 理论相对分子质量。DON-scFv 含有 257 个氨基酸, 其蛋白质理论相对分子质量为 27 400, 在 26 000~34 000 条带单一, 见图 4(b), 符合 DON-scFv 理论相对分子质量。



(a) ZEN-scFv蛋白电泳



(b) DON-scFv蛋白电泳

图 4 Expi293F 细胞表达的单链抗体的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of single chain antibodies expressed by Expi293F cells

2.3 ZEN-scFv 和 DON-scFv 亲和性验证

透析纯化后获得质量浓度为 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZEN-scFv。将 ZEN-scFv 稀释为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 测定其对 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZEN-BSA 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BSA 亲和性, 定义 ZEN-BSA 的吸光度 OD_{450} 为 P , BSA 的吸光度 OD_{450} 为阴性对照 N 。当 $P/N \geq 2.1$ 时, 则判定亲和性为阳性^[15]。如图 5 所示, ZEN-scFv 对应的 P 值为 2.57, N 值为 0.07, 两者比值为 36.71, 显著大于 2.1, 表明 ZEN-scFv 能够识别并结合抗原上偶联的 ZEN 分子, 亲和性为阳性。DON-scFv 经过纯化、二喹啉甲酸法蛋白质质量浓度测定后, 获得的最大 DON-scFv 质量浓度为 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。将 DON-scFv 稀释至质量浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行验证, 对 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

DON-OVA 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 OVA 测定亲和性。DON-scFv 对应的 P 值为 0.89, N 值为 0.10, 两者比值为 8.9, 表明 DON-scFv 能够识别并结合抗原上偶联的 DON 分子, 亲和性为阳性。

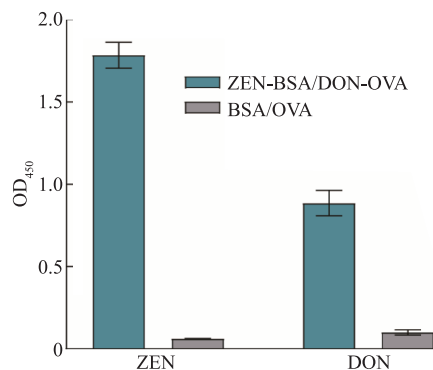


图 5 ZEN-scFv 和 DON-scFv 结合活性 ELISA 验证

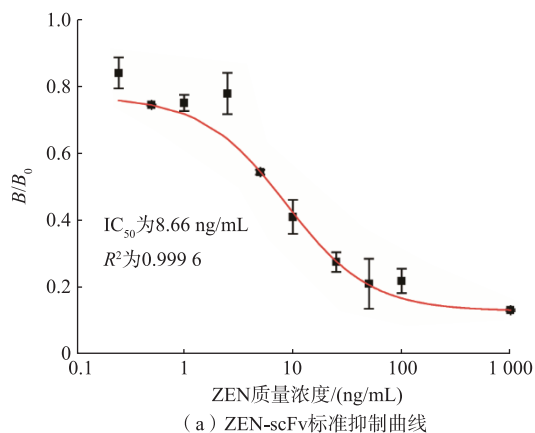
Fig. 5 ELISA validation of the binding activity of ZEN-scFv and DON-scFv

2.4 ZEN-scFv 和 DON-scFv 灵敏度的测定

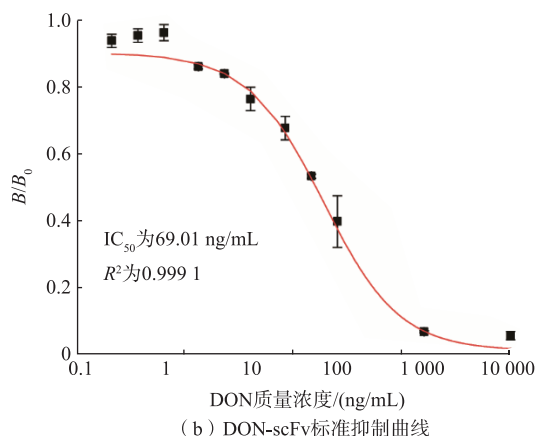
采用间接竞争 ELISA 法对 ZEN-scFv 和 DON-scFv 识别的灵敏性进行分析。首先利用 ELISA 棋盘优化确定当 ZEN-BSA 包被质量浓度为 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 、ZEN-scFv 包被质量浓度为 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 时, OD_{450} 约为 1.0。在此条件下, 建立了 0~1 000 ng/mL 的 ZEN 标准抑制曲线, 结果见图 6(a)。ZEN-scFv 的 IC_{50} 值为 8.66 ng/mL, 灵敏度较报道的该序列单特异性 ZEN-scFv (IC_{50} 为 11.20~14.00 ng/mL) 高^[16-17]。此外, DON-OVA 包被质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, DON-scFv 的质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。在该条件下, 在 DON 质量浓度为 0~10 000 ng/mL 建立标准曲线, 结果见图 6(b)。DON-scFv 的 IC_{50} 为 69.01 ng/mL, 表明对 DON 具有较高的敏感性, 能够满足国内对于粮食中 DON 限量 (1 000 $\mu\text{g/kg}$) 的检测要求。

2.5 双特异性抗体验证

6xHis、标签 DON-scFv 由 515 个氨基酸组成, 理论相对分子质量为 54 100。图 7(a) 显示在相对分子质量 55 000~72 000 存在清晰的单一蛋白质条带, 电泳条带与理论相对分子质量略微偏大, 可能是由于磷酸化或糖基化修饰使得蛋白质电荷发生改变从而影响了蛋白质在凝胶上的转移速度。进一步对 DON-OVA (1 $\mu\text{g/mL}$) 和 ZEN-BSA (1 $\mu\text{g/mL}$) 结合能力进行 ELISA 验证, 结果见图 7(b)。表达抗体 Bis-scFv 对 2 种抗原的 OD_{450} 与对照组 OVA/



(a) ZEN-scFv 标准抑制曲线



(b) DON-scFv 标准抑制曲线

图 6 单链抗体标准抑制曲线

Fig. 6 Standard inhibition curves for single chain antibodies

BSA 存在明显差异, P/N 远大于 2.1。可见, 通过 (Gly4Ser)3 Linker 连接 ZEN-scFv 和 DON-scFv 组成的双特异抗体 Bis-scFv 保留了 DON-scFv 和 ZEN-scFv 的亲识别功能。同时, 在相同抗原和抗体质量浓度下, Bis-scFv 对 ZEN 的 OD_{450} 比 DON 强, 表明 Bis-scFv 对 ZEN 具有更强的亲和力。

2.6 抗体灵敏度测定

ELISA 棋盘优化确定 ZEN-BSA 包被质量浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$, Bis-scFv 的质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 。将 ZEN 溶于体积分数 10% 的甲醇 PBS 中, 配制成质量浓度为 0.25~10 000 ng/mL 的标准品, Bis-scFv 对 ZEN 的非线性抑制曲线见图 8(a)。Bis-scFv 对 ZEN 表现良好的灵敏度, 其 IC_{50} 为 20.64 ng/mL。同样, ELISA 棋盘优化确定 8 $\mu\text{g/mL}$ 的 Bis-scFv 和 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DON-OVA 时, OD_{450} 值约为 1.0。在此条件下, 在 DON 为 0~10 000 ng/mL 建立非线性抑制曲线, 测得其 IC_{50} 为 132.29 ng/mL, 见图 8(b)。将 Expi293F

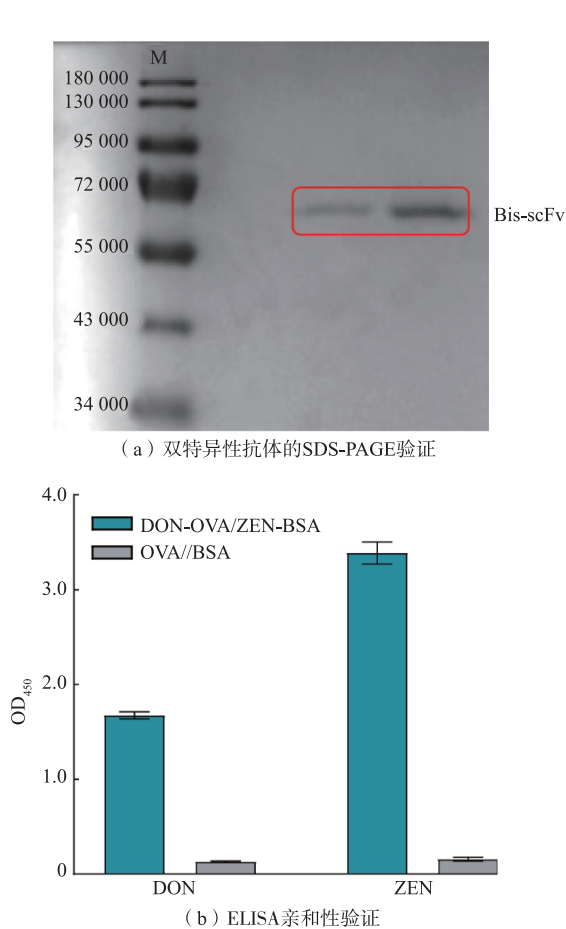


图7 双特异性抗体的SDS-PAGE和ELISA亲和性验证
Fig. 7 SDS-PAGE and ELISA validation of the affinity of bispecific antibody

表达的重组抗体与目前报道的单克隆抗体(mAb)进行比较,结果见表2。Expi293F表达的Bis-scFv与ZEN-scFv灵敏度相近,且与目前报道的部分抗ZEN mAb灵敏度相近。目前,欧盟和我国对于粮食中ZEN的最大限量分别为100、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$,ZEN-scFv和Bis-scFv能够满足ZEN的检测要求。与DON-scFv比较,Bis-scFv对DON的灵敏度显著下降,但仍显著优于部分报道的抗DON mAb。研究表明,scFv连接肽的长度以及VH和VL排列取向会导致不同结合活性和寡聚状态^[18-19]。Bis-scFv融合抗体的形式对DON敏感性的干扰大于ZEN,这可能是由ZEN-scFv和DON-scFv排列取向差异导致。

2.7 抗体特异性验证

为验证Bis-scFv对ZEN和DON识别的特异性,考察了OTA、AFB1、T-2毒素与Bis-scFv的结合

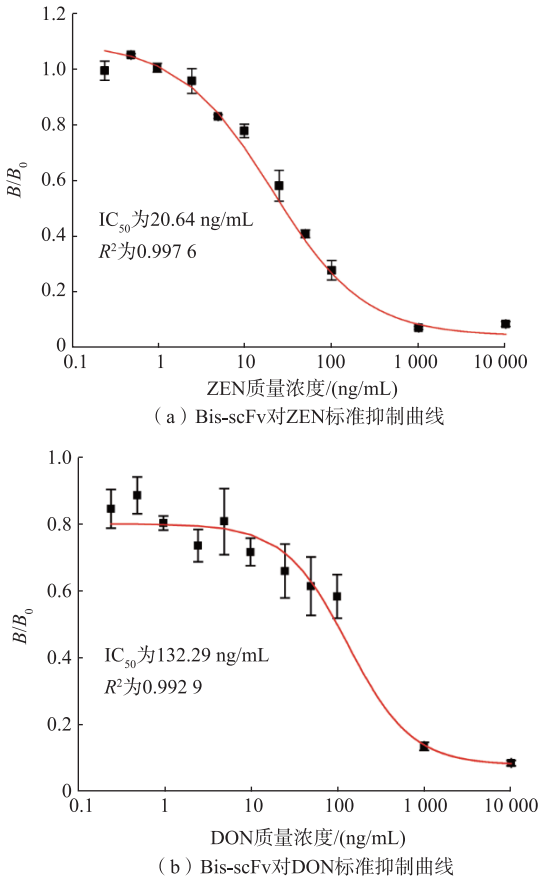


图8 双特异性抗体标准抑制曲线
Fig. 8 Standard inhibition curves of bispecific antibody

表2 重组表达抗体与传统抗体灵敏度比较
Table 2 Sensitivity comparison between the recombinant antibodies and the traditional antibodies

抗体类型	灵敏度 $IC_{50}/$ (ng/mL)	参考文献
ZEN-scFv	8.66	本研究
Bis-scFv	20.64	
ZEN mAb	10.38	[20]
	19.87	
	1.115	[21]
	17.23	[22]
	114	[23]
DON-scFv	69.01	本研究
Bis-scFv	132.29	
DON mAb	1 360	[24]
	22	[25]
	18 125	[26]
	9.84	[27]

能力,结果见图 9。在相同质量浓度的抗体和包被抗原的情况下,当 ZEN 和 DON 质量浓度达到 10 000 ng/mL 时,游离的 Bis-scFv 与游离的 ZEN 和 DON 结合,Bis-scFv 与 ZEN-BSA 和 DON-OVA 的结合受到抑制,此时抑制率接近 100%。当向体系加入质量浓度为 10 000 ng/mL 的 OTA、AFB1、T-2 毒素时,对抗体与包被抗原结合的抑制效果显著小于 DON 和 ZEN,抑制率小于 10%,这表明 OTA、AFB1、T-2 无法与 Bis-scFv 结合,Bis-scFv 与 OTA、AFB1、T-2 之间不存在明显的交叉反应。

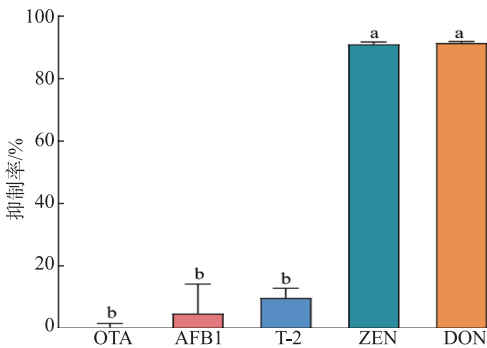
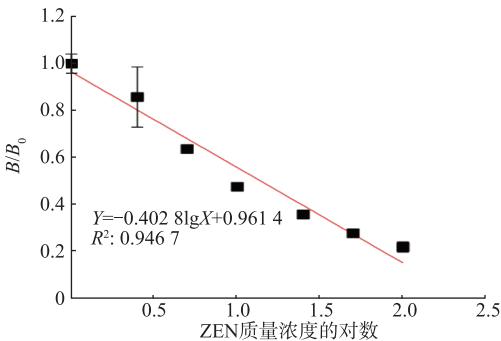


图 9 表达抗体 Bis-scFv 特异性

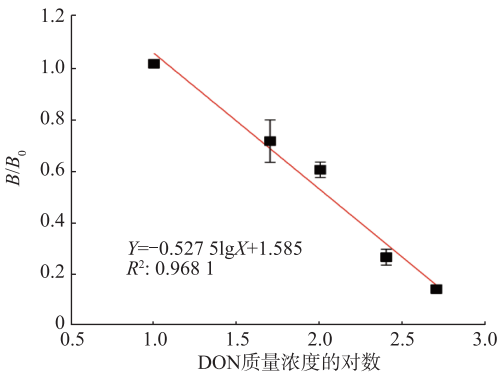
Fig. 9 Specificity of antibody Bis-scFv

2.8 基于双特异性抗体的 ELISA 检测方法构建

基于 Bis-scFv 建立 ELISA 检测方法,当 ZEN 质量浓度在 1~100 ng/mL 范围内时, B/B_0 与 ZEN 质量浓度对数值呈线型关系,见图 10(a)。线性关系为 $Y=-0.4028\lg X+0.9614$,线性拟合优度 $R^2=0.9467$, IC_{50} 为 13.98 ng/mL。当 DON 质量浓度在 10~500 ng/mL 范围内时,DON 质量浓度的对数与 B/B_0 线型关系为 $Y=-0.5275\lg X+1.585$,线性拟合优度 $R^2=0.9681$, IC_{50} 为 113.99 ng/mL,见图 10(b)。用 Bis-scFv-ELISA 检测 ZEN 和 DON 加标的玉米样品,结果见表 3。玉米粉中 ZEN 加标量为 40 $\mu\text{g/kg}$ 和 80 $\mu\text{g/kg}$,Bis-scFv-ELISA 测定的平均值为 34.45 $\mu\text{g/kg}$ 和 86.52 $\mu\text{g/kg}$,平均回收率为 86.13%~108.14%;玉米粉中 DON 加标量为 80 $\mu\text{g/kg}$ 和 240 $\mu\text{g/kg}$,Bis-scFv-ELISA 测定的平均值为 75.08 $\mu\text{g/kg}$ 和 206.44 $\mu\text{g/kg}$,平均回收率为 86.02%~93.85%。玉米样品加标回收检测结果表明,Bis-scFv-ELISA 具有良好的准确性,能够用于实际样品检测。将 Bis-scFv-ELISA 同步检测与基于单克隆抗体的同步检测方法进行比较,Bis-scFv-ELISA 具有更广定量检测范围,见表 4。



(a) Bis-scFv-ELISA对ZEN线性标准抑制曲线



(b) Bis-scFv-ELISA对DON线性标准抑制曲线

图 10 Bis-scFv-ELISA 线性标准抑制曲线

Fig. 10 Linear standard inhibition curves of Bis-scFv-ELISA

表 3 玉米粉的 DON 和 ZEN 加标检测结果 (n=3)

Table 3 Detection results of DON and ZEN in spiked corn flour samples (n=3)

加标毒素	加标量/($\mu\text{g/kg}$)	测定值/($\mu\text{g/kg}$)	CV/%	RSD/%
ZEN	40	34.45 \pm 3.26	86.13	11.60
	80	86.52 \pm 5.92	108.14	8.38
DON	80	75.08 \pm 8.58	93.85	13.99
	240	206.44 \pm 23.12	86.02	13.72

表 4 DON 和 ZEN 检测方法比较

Table 4 Comparison of DON and ZEN detection methods

检测方法	定量范围/(ng/mL)		CV/%	参考文献
	ZEN	DON		
间接 ELISA	1~100	10~500	86.02~108.14	本研究
时间分辨荧光免疫层析	0.2~5.0	0.5~50	91~106	[28]
双标签荧光免疫检测	0.37~50	0.019 4~100	83~108	[29]
胶体金免疫测定法	定性	定性	—	[30]

3 结 语

结合重组抗体表达技术,在 Expi293F 表达系统中成功表达了能够用于免疫检测的 ZEN-scFv 和 DON-scFv,IC₅₀ 分别为 8.66 ng/mL 和 69.01 ng/mL。基于性质良好的单特异性抗体片段进行基因改造,获得了具有 ZEN 和 DON 结合位点的 Bis-scFv。经 ELISA 验证,Bis-scFv 对 ZEN-BSA 和 DON-OVA 存在亲和性。Bis-scFv 对 ZEN 灵敏度接近 ZEN-scFv,IC-ELISA 的 IC₅₀ 为 20.64 ng/mL,而对 DON

敏感性显著下降,IC-ELISA 的 IC₅₀ 为 132.29 ng/mL。Bis-scFv 对 OTA、AFB1、T-2 毒素无显著的交叉反应,具有良好的特异性。基于 Bis-scFv 建立的 ELISA 检测方法,其对 ZEN 检测的线性范围为 1~100 ng/mL,DON 的检测线性范围为 10~500 ng/mL。Bis-scFv-ELISA 对玉米粉中 ZEN 和 DON 的加标回收率分别为 86.13%~108.14%和 86.02%~93.85%,相对标准偏差小于 15%,检测稳定性高,表明 Bis-scFv-ELISA 能够满足粮食中 ZEN 和 DON 检测要求。

参考文献:

- [1] PESTKA J J, SMOLINSKI A T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans[J]. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews**, 2005, 8(1): 39-69.
- [2] HAN X, HUANGFU B X, XU T X, et al. Research progress of safety of Zearalenone: a review[J]. **Toxins**, 2022, 14(6): 386.
- [3] HAN X, XU W, LI F, et al. Co-occurrence of mycotoxins, including aflatoxins, trichothecenes, and Zearalenone, in Chinese feedstuffs collected in 2013 and 2014[J]. **World Mycotoxin Journal**, 2019, 12(1): 77-88.
- [4] YANG X, GAO J, LIU Q, et al. Co-occurrence of mycotoxins in maize and maize-derived food in China and estimation of dietary intake[J]. **Food Additives & Contaminants**, 2019, 12(2): 124-134.
- [5] 任丹丹, 谢云峰, 李少晖, 等. 饲料及食品中玉米赤霉烯酮检测方法研究进展[J]. **分析测试技术与仪器**, 2015, 21(4): 199-204.
REN D D, XIE Y F, LI S H, et al. Research progress of determination methods of Zearalenone in feeds and food stuffs[J]. **Analysis and Testing Technology and Instruments**, 2015, 21(4): 199-204. (in Chinese)
- [6] 戴煌, 武旭悦, 黄金发, 等. 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法研究进展[J]. **现代食品科技**, 2021, 37(12): 319-328.
DAI H, WU X Y, HUANG J F, et al. Progress on the detection methods of deoxynivalenol in grain[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2021, 37(12): 319-328. (in Chinese)
- [7] 刘梅, 张晋欣, 刘沙沙, 等. 粮油作物中玉米赤霉烯酮检测方法研究进展[J]. **食品与生物技术学报**, 2021, 40(5): 12-20.
LIU M, ZHANG J X, LIU S S, et al. Progress in detection methods for Zearalenone in grain and oil crops[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(5): 12-20. (in Chinese)
- [8] YANG Y, LI G L, WU D, et al. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2020, 96: 233-252.
- [9] 黄小林, 李倩影, 吴雨豪, 等. 多重免疫层析试纸辅助食品安全快速检测的研究进展[J]. **食品与生物技术学报**, 2021, 40(11): 12-21.
HUANG X L, LI Q Y, WU Y H, et al. Research progress of multiplex immunochromatographic test strips for rapid food safety detection[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2021, 40(11): 12-21. (in Chinese)
- [10] SPIESS C, ZHAI Q T, CARTER P J. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies[J]. **Molecular Immunology**, 2015, 67(2): 95-106.
- [11] KRIANGKUM J, XU B, NAGATA L P, et al. Bispecific and bifunctional single chain recombinant antibodies[J]. **Biomolecular Engineering**, 2001, 18(2): 31-40.
- [12] BIRD R E, HARDMAN K D, JACOBSON J W, et al. Single-chain antigen-binding proteins[J]. **Science**, 1988, 242(4877): 423-426.
- [13] 陈龙冠, 覃锦红, 黄云娜, 等. 信号肽优化对重组抗体分泌表达的影响及研究进展[J]. **中国生物工程杂志**, 2016, 36(3): 77-81.
CHEN L G, QIN J H, HUANG Y N, et al. Optimized signal peptides sequences for the development of high expressing Mc abs[J]. **China Biotechnology**, 2016, 36(3): 77-81. (in Chinese)
- [14] VAZQUEZ-LOMBARDI R, NEVOLTRIS D, LUTHRA A, et al. Transient expression of human antibodies in mammalian cells[J]. **Nature Protocols**, 2018, 13(1): 99-117.

- [15] 陈晶. 抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体噬菌体库的构建、筛选及性质分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [16] YUAN Q, CLARKE J R, ZHOU H R, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain Fv antibody to the mycotoxin Zearalenone[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1997, 63(1): 263-269.
- [17] YUAN Q, HU W, PESTKA J J, et al. Expression of a functional anti Zearalenone single-chain Fv antibody in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2000, 66(8): 3499-3505.
- [18] DOLEZAL O, PEARCE L A, LAWRENCE L J, et al. ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in V(L) to V(H) orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers[J]. **Protein Engineering**, 2000, 13(8): 565-574.
- [19] DESPLANCQ D, KING D J, LAWSON A D, et al. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72. 3[J]. **Protein Engineering**, 1994, 7(8): 1027-1033.
- [20] WANG Y N, WANG X F, WANG S Y, et al. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody based on indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of Zearalenone in food and feed samples[J]. **Toxins**, 2022, 14(3): 220.
- [21] SUN Y N, HU X F, ZHANG Y, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of Zearalenone in corn[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, 62(46): 11116-11121.
- [22] WANG Y N, WANG X F, ZHANG H T, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies with high affinity and broad class specificity against Zearalenone and its major metabolites[J]. **Toxins**, 2021, 13(6): 383.
- [23] DONG G L, PAN Y H, WANG Y L, et al. Preparation of a broad-spectrum anti-Zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. **Food Chemistry**, 2018, 247: 8-15.
- [24] ABOUZIED M M, BEREMAND M N, MCCORMICK S P, et al. Reactivity of deoxynivalenol(vomitoxin) monoclonal antibody towards putative trichothecene precursors and shunt metabolites[J]. **Journal of Food Protection**, 1991, 54(4): 288-290.
- [25] GUO Y, SANDERS M, GALVITA A, et al. Heterologous screening of hybridomas for the development of broad-specific monoclonal antibodies against deoxynivalenol and its analogues[J]. **World Mycotoxin Journal**, 2014, 7(3): 257-265.
- [26] MOKHTAR H E, XU A D, XU Y, et al. Preparation of monoclonal antibody against deoxynivalenol and development of immunoassays[J]. **Toxins**, 2022, 14(8): 533.
- [27] HAN L, LI Y T, JIANG J Q, et al. Preparation and characterisation of monoclonal antibodies against deoxynivalenol[J]. **Italian Journal of Animal Science**, 2020, 19: 560-568.
- [28] 张少波, 邓常继, 张海涛, 等. 时间分辨荧光免疫层析法同时定量检测粮食中玉米赤霉烯酮和呕吐毒素[J]. **粮食科技与经济**, 2022, 47(1): 80-84.
- ZHANG S B, DENG C J, ZHANG H T, et al. Applicability evaluation of time-resolved fluoro-immunoassay quantitative detection system for ZEN and DON in grain[J]. **Food Science and Technology and Economy**, 2022, 47(1): 80-84. (in Chinese)
- [29] ZHANG J, GAO L, ZHOU B, et al. Simultaneous detection of deoxynivalenol and Zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2011, 91(2): 193-197.
- [30] KOLOSOVA A Y, SAEGER S D, SIBANDA L, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of Zearalenone and deoxynivalenol[J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2007, 389(7/8): 2103-2107.