

黄曲霉毒素新型抗体制备研究进展

江涛¹, 马良^{1,2,3*}, 张宇昊^{1,2,3}, 吴春生¹, 蒋黎艳¹, 戴芳芳¹

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2. 农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(重庆), 重庆 400715; 3. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400715)

摘要: 免疫学检测方法具有快捷、灵敏、特异性高的特点, 在毒素的定量和定性方面已获得了快速的发展, 成为毒素检测方法的研究热点。而高质量抗体的制备是建立特异性强、灵敏度高的免疫分析方法关键。目前主流研究和应用的抗体是单克隆抗体, 其性质稳定, 特异性强, 灵敏度高。随着抗体技术的发展, 重组抗体在免疫检测领域也逐渐应用。与多克隆抗体、单克隆抗体相比较而言, 重组抗体具有独特的优势, 可以在原核表达体系里短时间内大量生产且生产费用低廉, 对黄曲霉毒素的低成本、大规模检测有重要的应用价值。本文重点阐述和分析了黄曲霉毒素单克隆抗体、重组抗体制备过程中存在的影响因素及问题, 并对未来黄曲霉毒素抗体的发展前景进行了展望。

关键词: 黄曲霉毒素; 单克隆抗体; 重组抗体; 制备

Research progress of aflatoxin B₁ antibody preparation

JIANG Tao¹, MA Liang^{1,2,3*}, ZHANG Yu-Hao^{1,2,3}, WU Chun-Sheng¹,
JIANG Li-Yan¹, DAI Fang-Fang¹

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservations (Chongqing) Ministry of Agriculture, Chongqing 400715, China; 3. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT: Immunological detection methods with fast, sensitive and highly specific characteristics had gained a rapid development and become a hot detection methods. High quality antibody was the key of aflatoxins determination by specific and sensitive immunoassay methods. Monoclonal antibody was the most popular antibody in current researches and commercial products for their stability, high specificity and high sensitivity. More and more recombinant antibodies were researched and applied with the development of antibody technology. Compared to these two types of antibodies, an abundance of recombinant antibody can be produced in prokaryotic expression systems in a very short time with low cost. It will be helpful to the low-cost and high throughput detection method of aflatoxins. In this paper, the preparation processing of monoclonal and recombinant antibodies in aflatoxin detection were summarized and the key factors in the preparation of aflatoxins antibody were analyzed.

KEY WORDS: aflatoxins; monoclonal antibodies; recombinant antibodies; preparation

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB127803)、国家自然科学基金项目(31301476)

Fund: Supported by National Basic Research Program of China(2013CB127803) and the National Natural Science Foundation of China(31301476)

*通讯作者: 马良, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全与食品检测技术。E-mail: zhyhml@163.com

*Corresponding author: MA Liang, Associate Professor, Doctor, College of Food Science, Southwest University, No. 2, Tiansheng Road, Beibei District, Chongqing 400716, China. E-mail: zhyhml@163.com

1 引 言

黄曲霉毒素(aflatoxins, 简称 AFs)毒性大^[1,2], 污染广, 甚至在水产品中也有发现^[3], 给人们的健康造成了极大的威胁。高灵敏和高特异性的黄曲霉毒素检测方法是发现和 控制其污染的必要手段。免疫方法因其检测灵敏、操作简便、可以在短时间内完成等特点被越来越广泛地应用于黄曲霉毒素的检测^[4-6]。诸如酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫检测技术(radioimmunoassay, RIA)、金标免疫层析、免疫亲和技术等方法均都需要高质量的黄曲霉毒素特异性抗体^[7-8]发挥其高灵敏和高特异性的优势。目前主流应用和研究的 AFs 抗体主要包括单克隆抗体、重组抗体。二者比较, 单克隆制备过程复杂, 制备时间较长, 抗体质量受制备过程很多因素的影响; 重组抗体制备成本低, 可在短时间内获得大量抗体, 但在应用中存在亲和力低、特异性和稳定性较差等问题^[9]。本文就单克隆抗体和重组抗体等新型抗体发展和应用情况进行阐述, 分析 AFs 抗体制备过程中重点影响因素、存在的问题, 为抗体制备技术的完善以及其他真菌毒素的抗体制备提供一些思路和理论支撑等。

2 黄曲霉毒素单克隆抗体

单克隆抗体技术起源于 Kohler 等^[10]创建的体外鼠源杂交瘤技术, 利用该技术产生了仅识别一种表位的同源抗体^[11], 其制备是一项周期长、高度连续性的实验技术, 大体需要五个阶段: 免疫、融合、筛选、克隆和抗体大量制备; 并涉及大量细胞培养、免疫和生物化学等方法^[12]。

2.1 免疫阶段对单克隆抗体的影响

在免疫过程中, 不同的阶段, 如半抗原的改造方式、抗原纯度、抗原免疫剂量、注射途径、加强免疫时间等都对最后单克隆抗体质量都有一定的影响。肖智等^[13-14]认为, 与 AFBO-BSA 相比, 选用 AFB_{2a}-BSA 作为抗原, 可保留 B 族环戊烯与 G 族内酯差异, 能降低抗体与 G 族的交叉反应率。魏继涛^[15]认为小鼠免疫过程是否合理关系到小鼠血清效价的高低, 小鼠血清效价越高说明体内分泌特异性抗体的脾细胞越多, 在保证融合率的情况下, 出现阳性杂交瘤克隆孔的几率越大。

2.2 细胞的融合阶段的影响

影响细胞融合的因素主要有骨髓瘤细胞生长状况、脾细胞处理、细胞比例、培养基和血清质量、融合剂的选择、杂交瘤细胞筛选方法等。如果上清液中的抗体浓度过高, 使用间接 ELISA 筛选很容易产生假阳性结果, 而使用直接法虽可大大降低假阳性率, 但灵敏度较差, 且容易将高亲和力的抗体判断为假阴性^[16]。与酶联免疫法相比, 利用基

于芯片的化学发光免疫法对杂交瘤细胞进行筛选速度更快, 更敏感, 且仅用纳升上清液, 不到 5 min, 40 个克隆可被筛选完成^[17]。Zhang 等^[18-21]根据亚克隆的次数, 利用梯度筛选法选出 1 株亲和力好、灵敏度高的抗黄曲霉毒素细胞株(1C11)用于 ELISA 检测, 对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁ 的灵敏度分别为 1.2、1.3、2.2、18.0、13.2 pg/mL, 是目前报道的针对 AFB₁ 检测灵敏度最高的细胞株, 制备得到的单克隆抗体用于免疫层析法中, AFB₁ 检测限为 1 ng/mL。

2.3 单抗最后制备阶段影响因素

单克隆抗体的制备有体内培养法和体外培养法, 由于腹水中的抗体含量要远高于细胞培养上清, 一般选择体内诱生法制备^[22]。李涛^[23]研究了诱导剂、小鼠性别、年龄对制备腹水的影响, 结果表明用不完全弗氏佐剂诱导的小鼠腹水远高于石蜡, 10~12 周龄高于 6~8 周龄, 性别不同对腹水产量并没有什么影响。

3 重组抗体

重组抗体是按人类设计所重新组装的新型抗体分子, 可保留或增加天然抗体特异性和主要生物学活性, 去除或减少无关结构, 能在大肠杆菌中表达, 具有产量高、速度快、成本低的优点^[24-25]。目前研究的重组抗体主要有经典的单价抗体, 如: Fab、单链抗体(single chain antibody fragment, scFv)等, 还有一些基因工程抗体片段如: 双价抗体(diabodies)、三价抗体(triabodies)、单域抗体(single domain antibody, sdAb)^[26], 如图 1 所示。

3.1 单链抗体(scFv)

scFv(~27 kDa)是目前研究最多的 AFB₁ 基因工程抗体, 在 1980 年首先被制备用来替代单克隆抗体(~150 kDa)用于治疗^[27], 它的分子量约为完整抗体的 1/6^[28], 能保持亲本抗体抗原结合的特异性^[29]。

3.1.1 单链抗体的制备概述

scFv 是对抗体的基因进行重组, 表达由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过人工合成的链接肽(Linker)链接而成的抗体^[30], 它具有易于构建和表达、分子量小、穿透力强、特异性好、免疫原性低等优点^[31], 在毒素的检测中有着广阔的应用前景^[32]。与传统的抗体制备过程相比, scFv 绕过了免疫动物步骤, 可以在原核表达体系里短时间内大量生产, 且生产费用低廉, 并易于在体外进行亲和力改造^[33]。

Min 等^[34]制备的单链抗体对 AFB₁ 的亲合常数为 1.16×10^7 L/mol, 是其亲本单克隆抗体的 17 倍。Rangnoi^[35]从人类独特的噬菌体库中筛选出抗 AFB₁ 的 scFv, 将其基因与碱性磷酸酶基因融合, 表达后获得 scFv-AP, 用于一步竞争 ELISA 法, IC₅₀ 为 0.04 μg/mL。因母鸡免疫球蛋白

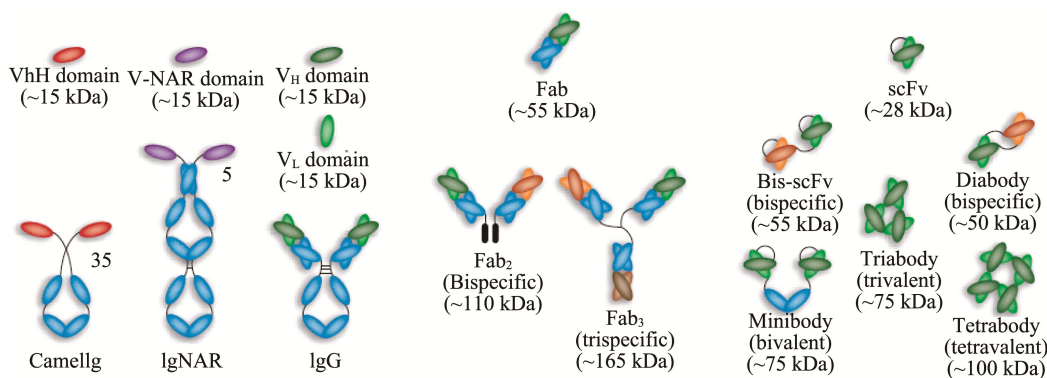


图 1 基因工程抗体片段

Fig. 1 Genetic engineering antibody fragments

重链和轻链基因位点只带有一个功能 V 区和一个功能 J 区, 与其他动物相比, 更容易建立噬菌体库, Xue 等^[36]利用母鸡获得的单链抗体基因与碱性磷酸酶融合后, 获得 scFv-AP, 检测限为 10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Dunne 等^[37]从免疫了的噬菌体库中筛选出能编码特异性 AFB₁ 单链抗体的基因, 将其转入大肠杆菌中表达出单体和二聚体的单链抗体, 并将其分别用于基于表面等离子体共振的抑制免疫学方法, 它们的检测范围分别为 390~12000 pg/mL 和 190~24000 pg/mL 。Li 等^[38]从产 AFB₁ 单抗的 20 个杂交瘤细胞系, 克隆出抗体的 VH 和 VL 基因, 建立了库容量为 3.5×10^5 的抗体库, 筛选出的 scFv 对 AFB₁ 灵敏度为 0.01 ng/mL 。

3.1.2 制备单链抗体的影响因素

单链抗体的高效表达水平是由多因素、多水平共同决定的, 其中包括抗体的基因序列、抗体库的筛选策略、高效表达载体构建、抗体表达系统等^[39,40]。

3.1.3 Linker 设计的影响

常用的 Linker 是由甘氨酸(G)和丝氨酸(S)组成的 15~20 个氨基酸序列组成, 如: GGGSGGGSGGGGS^[28]。在 Linker 的设计中, 不能干扰 VH 和 VL 的空间构象, 不能对抗原结合部位造成阻碍, 不能引起分子动力学改变, 尽可能减少蛋白酶攻击, 防止 scFv 聚集^[41], 设计时 VH 和 VL 的取向可以是 VH-Linker-VL 也可以是 VL-Linker-VH, 两种方式都不影响 scFv 的特异性, 但是 VH-Linker-VL 比 VL-Linker-VH 亲和力高 10 倍以上, 而 VL-Linker-VH 比 VH-Linker-VL 的表达量高 20 倍^[42]。

3.1.4 表达系统的影响

Miller 等^[43]比较了酿酒酵母、毕赤酵母和大肠杆菌细胞对 scFv 的表达, 结果是大肠杆菌表达细胞是获得纯化 scFv 速度最快的表达系统, 且它的生长速度快, 易于操作, 转化和转导率高, 可在短时间进行大规模生产^[44-45]。

3.1.5 其他因素影响

在单链抗体基因的拼接中, 采用两片段重叠延伸 PCR 法, 使抗体重链与轻链随机的连接在一起, 可以提高

组装效率, 增加抗体库的多样性^[46]。在对抗体库筛选时, 直接将 AFB₁ 包被在酶标板上, 能避免载体对筛选的干扰和误导, 且利用竞争-胰蛋白酶联用洗脱, 含目标抗体片段的噬菌体比例会大幅提高^[47], 可提高筛选效率。杨炼等^[48-49]通过对比几种载体对最终 scFv 活性和产率的影响, 筛选出 PET22b 作为 AFB₁ 单链抗体的最优表达载体。

单链抗体没有恒定区, 具有很大的构象自由, 在应用中存在亲和力低的问题^[9], 可采用同源建模及其分子对接等技术探索抗体与抗原高灵敏度识别起关键作用的氨基酸残基模型, 为 AFs 重组抗体的体外亲和力改造提供依据, 提高针对黄曲霉毒素的亲和力和特异性^[47]。此外也能通过在结构域间引入二硫键、链更替、定点突变或构建多价抗体的方法对 scFv 亲和力进行改造^[50]。

3.2 单域抗体

单域抗体只由重链可变区组成, 晶体直径 2.5 nm, 长 4 nm, 又称纳米抗体, 它是自然界存在可与抗原结合的最小片段^[51]。单域抗体拥有较长的 CDR3, 可形成稳定的暴露凸环结构(凸环中具有稳定的二硫键), 能够深入抗原内部以更好地结合抗原, 从而提高其抗原特异性和亲和力^[52], 而传统抗体 Fab 片段及单链抗体 scFv 的抗原结合表面常形成凹性能拓扑结构, 通常只能识别位于抗原表面位点^[53]。纳米抗体在水溶液中能稳定存在, 聚合性减少, 在室温下能稳定保存, 具有特异性强, 交叉反应率低, 亲和力高, 表达性高的特性。

单域抗体也通过克隆重链可变区基因, 构建噬菌体库, 经过淘洗富集, 转入表达系统表达纯化得到。目前还基本没有抗 AFs 纳米抗体的报道, 但纳米抗体是抗体制备发展的重要方向之一。Muyldermans 等^[54]将纳米抗体重组, 作为生物传感器探针, 用于食品中的其他有毒物质检测。目前也有抗三氯二苯胺和 3-苯氧基苯甲酸单域抗体报道, 并用它们建立了竞争 ELISA^[55-56]。

此外用单域抗体作为抗独特性抗体也具有很大优势,

目前已有报道用于诊断和治疗^[57-58]。根据网络免疫学说, 制备抗独特性抗体, 可成为毒素标准品替代物。Fan 等^[59]制备了 AFB₁ 抗独特性单域抗体, 但该抗体主要以包涵体形式存在, 经过溶解和复性后确定该抗体具有与 AFB₁ 抗体结合的特性。Wang 等^[60]利用 AFB₁ 单克隆抗体 1C11 作为抗原免疫羊驼, 得到抗特异性单域抗体, 经测定, 该抗体能够作为 ELISA 检测中的包被原, 替代毒素分子偶联物, 减少毒素标准品使用。Liu 等^[61]通过抗 AFB₁ 的 F(ab')₂ 免疫小鼠获得抗独特性抗体, 通过荧光光谱特性和圆二色谱分析, 也可作为毒素替代物。

4 讨论和展望

AFs 抗体制备是免疫检测的重点。目前抗体技术快速发展, 具有较大的研究前景和潜力, 但在 AFs 抗体制备方面仍有很多因素影响抗体质量。通过分析, 笔者认为从以下几个方面可以进行深入研究和展望。

(1) AFs 的分子量小, 抗体质量很大一部分取决于半抗原的设计。目前主要用于制备 AFs 抗体的抗原是 AFs-BSA, 连接方式比较单一。因此可以探索新的完全抗原制备方法, 在化学合成方法上加以改进, 以增加制备多抗的灵敏度和提高获得单抗几率。

(2) 目前 AFs 最容易制备成功的抗体仍是多克隆抗体, 单克隆抗体虽有大量报道, 但对实验仪器和实验人员要求高, 影响获得抗体的因素多, 很难保证一次细胞融合就能获得产目标抗体的杂交瘤细胞, 因此耗时长、人力大、费用高, 要筛出高灵敏度抗体更要控制好各个影响因素。为了减少人为因素影响, 单克隆抗体制备过程中需要朝着仪器化方向发展, 以提高效率和获得几率, 如细胞的融合和筛选过程, 且目前单抗制备主要依靠向小鼠腹腔注射杂交瘤细胞, 制备腹水获得, 采用这种方式获得量少, 周期长。需要探究将产目标抗体的杂交瘤细胞用于发酵罐大型培养的方式来获得单抗, 更有利于单克隆抗体的商业化。

(3) 基因工程抗体现目前主要用于临床诊断和治疗。用于免疫检测尚处于研究阶段, 并没有进行商业化。研究最多的 scFv, 其亲和力的加强和特异性改造还需进一步研究。分析认为可以在基因上对抗体进一步改造, 如将其还原为 minibodies(如: 在抗体的设计中, 引入 Fc 区)等。此外, 对 AFB₁ 的 scFv 也可进行多系统表达探究, 提高 scFv 表达活性和表达量。sdAb 的可变区是最小抗体的结合片段, 但保持了抗体的特异性和稳定性, 在大肠杆菌中的表达比 scFv 高, 是 AFs 抗体发展方向。

参考文献

- [1] Jaimez J, Fente CA, Vazquez BI, *et al.* Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. *J Chromatogr A*, 2000, 882(1): 1-10.
- [2] Groopman JD, Kensler TW. Role of metabolism and viruses in aflatoxin-induced liver cancer[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 206(2): 131-137.
- [3] 孔青, 林洪, 管斌. 水产品中的黄曲霉毒素: 一个潜在的食品安全问题[J]. *食品科学*, 2013, 34(15): 324-328.
Kong Q, Lin H, Guan B. The aflatoxins in aquatic products: a potential food safety problems[J]. *Food Sci*, 2013, 34(15): 324-328.
- [4] He QH, Xu Y, Wang D, *et al.* Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay[J]. *Food Chem*, 2012, 134(1): 507-512.
- [5] Shiu CM, Wang JJ, Yu FY. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and rapid one-step immunochromatographic strip for fumonisin B1 in grain-based food and feed samples[J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90(6): 1020-1026.
- [6] Jiang W, Wang Z, Nölke G, *et al.* Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay[J]. *Food Anal Methods*, 2013, 6(3): 767-774
- [7] Zhang Q, Wang L, Ahn KC, *et al.* Hapten heterology for a specific and sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus insecticide fenthion[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 596(2): 303-311.
- [8] Zhang A, Ma Y, Feng L, *et al.* Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China[J]. *Food Control*, 2011, 22(11): 1723-1728.
- [9] Shepelyakovskaya AO, Laman AG, Lomonosova AV, *et al.* Effect of the format of antibodies on their specificity[J]. *Mol Immunol*, 2011, 49(3): 433-440.
- [10] Shulman M, Wilde CD, Köhler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies[J]. *Nature*, 1978, 276(5685): 269.
- [11] Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256: 49.
- [12] 王海彬, 李培武, 张奇. 粮油产品真菌毒素抗体制备研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(3): 336-342.
Wang HB, Li PW, Zhang Q. Progress in the preparation of fungi toxins' antibodies in grain and oil products[J]. *Chin Oil Crop Sci*, 2012, 34(3): 336-342.
- [13] 肖智. 高特异性黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的研制[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2010.
Xiao Z. The research of highly specific monoclonal antibodies of aflatoxin B₁[D]. Wuhan: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [14] 肖智, 李培武, 张奇. 高特异性黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及特异性研究[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(1): 66-70.
Xiao Z, Li PW, Zhang Q. The research of highly specific monoclonal antibodies of aflatoxin B₁[J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2011, 33(1): 66-70.
- [15] 魏继涛. 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
Wei JT. The preparation and characterization of aflatoxin B₁ monoclonal antibodies[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [16] Cervino C, Weber E, Knopp D, *et al.* Comparison of hybridoma screening methods for the efficient detection of high-affinity

- haptent-specific monoclonal antibodies[J]. *J Immunol Methods*, 2008, 329(1-2):184-193.
- [17] Karsunke XYZ, Pschenitzka M, Rieger M, *et al.* Screening and characterization of new monoclonal anti-benzo [a] pyrene antibodies using automated flow-through microarray technology[J]. *J Immunol Methods*, 2011, 371(1): 81-90.
- [18] Zhang D, Li P, Zhang Q, *et al.* Production of ultrasensitive generic monoclonal antibodies against major aflatoxins using a modified two-step screening procedure[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 636(1): 63-69.
- [19] Zhang DH, Li PW, Zhang Q, *et al.* A high selective immunochromatographic assay for rapid detection of aflatoxin B₁[J]. *Talanta*, 2011, 85(1): 736-742.
- [20] Li PW, Zhang Q, Zhang W, *et al.* Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. *Food Chem*, 2009, 115: 313-317.
- [21] Zhang DH, Li PW, Zhang Q, *et al.* Ultrasensitive nanogold probe-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of total aflatoxins in peanuts[J]. *Biosensors Bioelectron*, 2011, 26: 2877-2882.
- [22] 周有祥. 抗黄曲霉毒素 B₁ 抗独特性抗体的构建历程、特性及机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- Zhou YX. The research of the preparation, characteristics and mechanism of unique aflatoxin B₁ antibodies[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [23] 李涛. 抗黄曲霉毒素 B₁ 单克隆抗体的制备与特性鉴定[D]. 济南: 山东师范大学, 2008.
- Li T. Preparation and identification of anti-aflatoxin B₁ monoclonal antibody[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2008.
- [24] Li T, Zhang Q, Liu Y, *et al.* Production of recombinant ScFv antibodies against methamidophos from a phage-display library of a hyperimmunized mouse[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(24): 9085-9091.
- [25] Li T, Cheng J, Hu B, *et al.* Construction, production, and characterization of recombinant scFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(6): 867-874.
- [26] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains[J]. *Nature Biotechnol*, 2005, 23(9): 1126-1136.
- [27] Borrebaeck C, Wingren C. Recombinant antibodies for the generation of antibody arrays[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 785: 247-262.
- [28] Lamberski JA, Thompson NE, Burgess RR. Expression and purification of a single-chain variable fragment antibody derived from a polyol-responsive monoclonal antibody[J]. *Protein Expres Purif*, 2006, 47(1): 82-92.
- [29] Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule[J]. *Mol Immunol*, 1994, 31(3): 169-217.
- [30] Zeng X, Shen Z, Mernaugh R. Recombinant antibodies and their use in biosensors[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 402(10): 3027-3038.
- [31] Maragos C M. Recent advances in the development of novel materials for mycotoxin analysis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(5): 1205-1213.
- [32] Blažek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments[J]. *Folia Microbiol*, 2003, 48(5): 687-698.
- [33] 王铁斌. 抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的筛选和鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- Wang TB. Screening and indentification of anti-aflatoxin B₁ single-chain antibody[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
- [34] Min WK, Kweon DH, Park K, *et al.* Characterisation of monoclonal antibody against aflatoxin B₁ produced in hybridoma 2C12 and its single-chain variable fragment expressed in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Food Chem*, 2011, 126: 1316-1323.
- [35] Rangnoi K, Jaruseranee N, O'Kennedy R, *et al.* One-Step Detection of Aflatoxin-B₁ Using scFv-Alkaline Phosphatase-Fusion Selected from Human Phage Display Antibody Library[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 49(3): 240-249.
- [36] Xue S, Li HP, Zhang JB, *et al.* A chicken single-chain antibody fused to alkaline phosphatase detects *Aspergillus* pathogens and their presence in natural samples by direct sandwich ELISA[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(22): 10992-10999.
- [37] Dunne L, Daly S, Baxter A, *et al.* Surface Plasmon Resonance - Based Immunoassay for the Detection of Aflatoxin B₁ Using Single-Chain Antibody Fragments[J]. *Spectrosc Lett*, 2005, 38(3): 229-245.
- [38] Li X, Li P, Lei J, *et al.* A simple strategy to obtain ultra-sensitive single-chain fragment variable antibodies for aflatoxin detection[J]. *RSC Adv*, 2013, 3(44): 22367-22372.
- [39] 胡迪超, 张爱华, 杨晓明. 重组抗体高效表达的研究进展 (I)[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(1): 129-134.
- Hu DC, Chao AH, Yang XM. Progress in high-level expression of recombinant antibody(I) [J]. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(1): 129-134.
- [40] 胡迪超, 张爱华, 杨晓明. 重组抗体高效表达的研究进展 (II)[J]. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(002): 280-288.
- Hu DC, Chao AH, Yang XM. Progress in high-level expression of recombinant antibody(II) [J]. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(002): 280-288.
- [41] Takkinen K, Laukkanen ML, Sizmman D, *et al.* An active single-chain antibody containing a cellulose linker domain is secreted by *Escherichia coli* [J]. *Protein Eng*, 2007, 4: 837-841.
- [42] 秦海燕, 毛晓燕, 乔玉玲, 等. 单链抗体的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(4): 795-771.
- Qin HY, Mao XY, Qiao YL, *et al.* Progress in single-chain antibody[J]. *Progr Mod Biomed*, 2011, 11(4): 795-771.
- [43] Miller KD, Weaver-Feldhaus J, Gray SA, *et al.* Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*[J]. *Protein Expres Purif*, 2005, 42: 255-267.
- [44] Pepper LR, Cho YK, Boder E T, *et al.* A decade of yeast surface display technology: where are we now?[J]. *Comb Chem & High Throughput Scr*, 2008, 11(2): 127-134.
- [45] Fernández LA. Prokaryotic expression of antibodies and affibodies[J]. *Curr Opin in Biotechnol*, 2004, 15(4): 364-373.
- [46] 刘彬, 李长青, 林芳昭, 等. 大容量人源核糖体展示单链抗体文库的构建[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(11): 1454-1458.
- Liu B, Li CQ, Lin FZ, *et al.* Construction of a large human ribosome display library of single-chain antibody[J]. *Chin Biologicals*, 2012, 25(11): 1454-1458.
- [47] 杨炼. 抗黄曲霉毒素 B₁ 的单链抗体的筛选、表达和改造[D]. 无锡: 江南大学, 2010.

- Yang L. The screening, expression and transformation of anti-aflatoxin B₁ single-chain antibody[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2010.
- [48] 杨炼, 刘自琴, 刘荣. 抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的表达载体比较[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 171-176
- Yang L, Liu ZQ, Liu R. The comparison of anti-aflatoxin B₁ single-chain antibodies' expression vectors[J]. Food Sci, 2010, 31(9): 171-176.
- [49] 王铁斌, 丁虎生, 杨炼, 等. 抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的筛选和鉴定[J]. 微生物学简报, 2009, 49(1): 135-140.
- Wang TB, Ding FS, Yang L, *et al.* Screening and identification of anti-aflatoxin B₁ single-chain antibody[J]. Acta Microbiol Sinica, 2009, 49(1): 135-140.
- [50] Zhao JX, Yang L, Gu ZN, *et al.* Stabilization of the single-chain fragment variable by an interdomain disulfide bond and its effect on antibody affinity[J]. Int J Mol Sci, 2010, 12(1): 1-11.
- [51] 郭婷, 张宇昊, 马良. 纳米抗体的特性及其应用研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 294-297.
- Gu T, Zhang YH, Mang L. Nanobodies characteristics and Research Progress[J]. Food Sci, 2013, 34(3): 294-297.
- [52] Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 1-23.
- [53] Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, *et al.* Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies African trypanosomes as paradigm[J]. J Biol Chem, 2004, 279(2): 1256-1261.
- [54] Muyldermans S, Baral TN, Retamazzo VC, *et al.* Camelid immunoglobulins and nanobody technology[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2009, 128(1): 178-183.
- [55] Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, *et al.* Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity anti-hapten antibodies that are not favored in the llama immune response[J]. Anal Chem, 2011, 83(18): 7213-7220.
- [56] Kim HJ, McCoy MR, Majkova Z, *et al.* Isolation of alpaca anti-hapten heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay[J]. Anal Chem, 2011, 84(2): 1165-1171.
- [57] Klooster R, Maassen BTH, Stam JC, *et al.* Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology[J]. J Immunol Methods, 2007, 324(1): 1-12.
- [58] Alvarez-Rueda N, Ladjemi MZ, Béhar G, *et al.* A llama single domain anti-idiotypic antibody mimicking HER2 as a vaccine: Immunogenicity and efficacy[J]. Vaccine, 2009, 27(35): 4826-4833.
- [59] Fan F, Yang X, Dan W, *et al.* Prokaryotic expression and renaturation of anti-idiotypic nanobody against aflatoxin B₁[J]. J Food Safe Qual, 2013, 4(4): 1222-1227.
- [60] Wang Y, Li P, Majkova Z, *et al.* Isolation of Alpaca Anti-Idiotypic Heavy-Chain Single-Domain Antibody for the Aflatoxin Immunoassay[J]. Anal Chem, 2013, 85(17): 8298-8303.
- [61] Liu A, Yang H, Wang X, *et al.* Spectral characteristics of fluorescence and circular dichroism of aflatoxin B₁ reaction with its anti-idiotypic antibody[J]. J Mol Struct, 2012, 1028: 73-78.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



江 涛, 研究生, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: jjiang13637956153@163.com



马 良, 博士, 副教授, 主要研究方向为现代食品检测技术及污染物分析。

E-mail: zhyhml@163.com