

拟除虫菊酯类农药单链可变区抗体的制备、 鉴定及其特异性分析

吴元元¹, 金 朵¹, 付骋宇², 祁志军^{1,3*}

(1. 西北农林科技大学农药研究所, 杨凌 712100; 2. 陕西省进出口检验检疫局, 西安 710068;
3. 植物源农药研究与开发陕西省重点实验室, 杨凌 712100)

摘 要: **目的** 制备拟除虫菊酯类农药可溶性单链可变区(single-chain fragment variable, scFv)抗体, 鉴定其免疫活性并对其特异性进行分析。**方法** 构建表达载体 pET28a(+)-scFv 和 pET42a(+)-scFv 并转化 BL21(DE3), 重组菌经诱导后通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定目的蛋白的表达。可溶性融合蛋白 scFv/GST 经 Glutathione Sepharose 4B 纯化后用 Factor Xa 切除 GST 标签获得 scFv, 然后采用 Western blotting 法对其进行鉴定。scFv 对 7 种拟除虫菊酯类农药的特异性采用间接竞争酶联免疫法进行分析。**结果** 经 0.1 mmol/L IPTG 诱导后, 重组菌 BL21(DE3)-pET28a(+)-scFv 和 BL21(DE3)-pET42a(+)-scFv 表达的目标蛋白分别为包涵体抗体和部分可溶性抗体。经鉴定, 可溶性 scFv 相对分子量约为 30 kDa, 效价为 1:25600。同源半抗原 Hap1 对单链抗体 scFv 的 IC₅₀ 为 2.43 μg/mL, 检出限为 0.045 μg/mL; scFv 抗体对氯菊酯、氯氰菊酯、溴氰菊酯均有较高特异性, IC₅₀ 分别为 3.29、4.72 和 5.55 μg/mL。**结论** 本研究成功获得了拟除虫菊酯类农药的可溶性单链可变区抗体, 该抗体对 3 种拟除虫菊酯农药具有很强的特异性, 该研究可为拟除虫菊酯类农药多残留免疫分析提供依据。

关键词: 拟除虫菊酯类农药; 单链可变区抗体; 多残留免疫分析

Preparation, characterization and specificity analysis of single-chain fragment variable antibody against pyrethroid pesticides

WU Yuan-Yuan¹, JIN Duo¹, FU Cheng-Yu², QI Zhi-Jun^{1,3*}

(1. Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China; 3. Key Laboratory of Botanical Pesticide R & D in Shaanxi Province, Shaanxi 712100, China)

ABSTRACT: Objective To prepare the soluble single-chain fragment variable (scFv) antibody against pyrethroid pesticides, identify its immune activity and analyze its specificity. **Methods** The recombinant expression vectors pET28a(+)-scFv and pET42a(+)-scFv were transformed into BL21(DE3). The target proteins were identified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after induction of recombinant bacteria. scFv/GST was purified by Glutathione Sepharose 4B, and scFv was obtained after excision of GST with Factor Xa,

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900955)、国家检验检疫总局科技项目(2014IK016)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900955) and The Technology Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2014IK016)

*通讯作者: 祁志军, 副教授, 主要研究方向为新农药研究与开发及农药免疫分析。E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn

*Corresponding author: QI Zhi-Jun, Associate Professor, Institute of Pesticide Research, Northwest A&F University, 61# Postbox, No. 22, Xinong Road, Yangling Demonstration Zone, Yangling 712100, China. E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn

and then identified by Western blotting. The specificity of scFv against seven pyrethroid pesticides was analyzed by indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay (IC-ELISA). **Results** After the recombinant strains BL21 (DE3)-pET28a(+)-scFv and BL21 (DE3)-pET42a(+)-scFv were induced by 0.1 mmol/L IPTG, the target proteins expressed in the form of inclusion body and partially in the soluble form, respectively. After being cleaved the GST-Tag, the soluble fusion protein gave out 30 kDa-scFv, and its titer reached 1:25600. The IC_{50} of the homologous hapten1 to scFv was 2.43 $\mu\text{g/mL}$ and the detection limit was 0.045 $\mu\text{g/mL}$. Specificity analysis showed that the IC_{50} of scFv to permethrin, cypermethrin and deltamethrin were 3.29, 4.72 and 5.55 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** In this study, a soluble scFv antibody against pyrethroid pesticides was successfully obtained with high specificity to three pyrethroids, which can provide the basis for multi-residual immunoassay of pyrethroid pesticides.

KEY WORDS: pyrethroid pesticides; single-chain variable fragment; multi-residual immunoassay

1 引言

随着一批高毒农药被全面禁用, 拟除虫菊酯类农药以高效、低毒、低残留、杀虫谱广等优点被广泛用于害虫防治领域。但由于拟除虫菊酯类农药残留期长, 通过食物链可进入到机体内对哺乳动物的心血管、免疫和生殖产生有毒副作用^[1,2], 且对某些非靶标生物毒性很高, 因此我国对不同拟除虫菊酯类农药规定了相应的最大残留限量^[3]。自 20 世纪 80 年代以来, 免疫学技术在农药残留检测方面的应用越来越深入, 其中酶联免疫分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术为测定农药残留提供了一种痕量、快速、灵敏、选择性好的方法。迄今已建立的测定拟除虫菊酯类农药残留的免疫吸附分析方法中使用的抗体主要以多克隆抗体^[4-6]为主, 也有少量使用单克隆抗体^[7-9]。随着基因工程抗体及噬菌体展示技术的兴起, 可以直接利用噬菌体展示技术筛选获得单链抗体(single chain variable fragment, scFv), 从而避免动物免疫制备抗体的周期长、操作复杂等不利因素。但从噬菌体抗体库中获得的 scFv 是以融合形式展示于噬菌体的表面, 而在实际应用中则需要制备可溶性表达的 scFv^[10]以建立免疫分析方法。寻求单链抗体的可溶性表达方法并增加表达产量是提高抗体特异和亲和力的关键环节。因此本研究拟对利用噬菌体展示技术筛选获得的对同源半抗原 Hap1 具有较高亲和性($IC_{50}=0.329 \mu\text{g/mL}$)的 scFv 序列^[11]构建 pET28a(+)-scFv 和 pET42a(+)-scFv 重组表达载体, 开展单链抗体的可溶性表达研究, 为建立基于可溶单链抗体的拟除虫菊酯类农药多残留免疫分析方法奠定基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

F15-6×100y 高速低温冷冻离心机、Multiskan MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司); VS-1300L-U 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); HZQ-F100 全温振荡培养箱(苏州

培英实验设备有限公司); DRP-9032 电热恒温培养箱(上海森信试验仪器有限公司); LabCycler Smart SG PCR 仪(德国 SENSO 公司); DYNC-24DN 电泳仪(北京市六一仪器厂); LG2000 凝胶成像系统(杭州朗基科学仪器有限公司); 170-3940 半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司); JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 40196#96 孔酶标板(BEAVER Nano 公司)。

pCANTAB 5E-scFv 重组质粒、半抗原 Hap1、包被抗原 Hap1-BSA(本实验室制备保存); 菌株 BI21(DE3)、DH5 α 、质粒 pET28a(+), pET42a(+)(德国 Novagen 公司); 引物 F-Nde I、R-Not I、F-Nco I 和 R-Not I 由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成; 质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒(美国 Omega 公司); Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶试剂盒(大连 Takara 公司); Nco I、Not I 限制性内切酶(美国 NEB 公司); 谷胱甘肽琼脂糖树脂 Glutathione Sepharose 4B、Factor Xa(美国 GE 公司); 卡那霉素、还原性谷胱甘肽、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(美国 MP 生物试剂公司); 胰蛋白酶、酵母提取物(英国 OXOID 公司); DAB 显色液、TMB 底物显色试剂盒、HRP/Anti-His 鼠单克隆抗体(北京康为世纪公司); 脱脂奶粉(美国 BD 公司); 农药标准品: 氯氟菊酯、氯菊酯、溴氰菊酯、联苯菊酯、氰戊菊酯、醚菊酯、氟氰胺菊酯(北京世纪奥科生物技术有限公司); 其他试剂均为国产分析纯试剂。

2.2 实验方法

2.2.1 scFv 原核表达载体的构建、鉴定及测序

以 pCANTAB 5E-scFv 重组质粒为模板, 分别以 F-Nde I 和 R-Not I、F-Nco I 和 R-Not I (序列见表 1)为两对引物, 扩增 scFv 片段。扩增结束后分别进行 1%琼脂糖凝胶回收纯化 PCR 产物。将回收的 scFv 片段分别用所对应引物中的限制性内切酶双酶切, 质粒 pET28a(+)用 Nde I 和 Not I 双酶切, 质粒 pET42a(+)用 Nco I 和 Not I 双酶切后, 将具有相同粘性末端的 scFv 片段与载体片段按照物质的量比为 1:3 混合, 利用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接

过夜。取 2 μL 连接产物转化 50 μL 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,活化后涂布于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 培养基中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日挑取单克隆菌落进行菌落 PCR,将鉴定为阳性的菌落扩大培养提取质粒,送上海 Invitrogen 公司测序^[12,13],阳性重组质粒分别命名为 pET28a(+)-scFv、pET42a(+)-scFv。

表 1 引物的名称与序列
Table 1 Names and sequences of primers

引物名称	引物序列(5'-3')
F-Nde I	CCCATATGATGGGCCAGGTCCAAC
F-Nco I	CATGCCATGGTTATGGGCCAGGTCCAAC
R-Not I	TTGCGGCCGCAACCGTTTATTTC

2.2.2 pET28a(+)-scFv 的诱导表达和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)鉴定

将阳性重组质粒 pET28a(+)-scFv 转化至原核表达宿主 BL21(DE3)菌中,抗性筛选重组克隆后阳性菌落接种至含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中。37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6,加异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG)使其终浓度为 0.1 mmol/L, 15、25 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 分别诱导表达 10、15 h,以不加 IPTG 诱导的培养物为对照。收集诱导菌液用 PBS(pH 7.4)悬浮后,采用超声破碎仪破碎(功率 200 W,超声时间 3 s,间隔时间 5 s,直至菌体清亮)后分别收集上清液和沉淀,加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,用 12%SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白表达情况。

2.2.3 pET42a(+)-scFv 的诱导表达和 SDS-PAGE 鉴定

采用 2.2.2 中所述的方法诱导重组菌 BL21(DE3)-pET28a(+)-scFv。为了避免表达产物过多形成包涵体,尝试使用低温低诱导剂浓度的方法,诱导表达条件设置为: IPTG 终浓度 0.1 mmol/L, 15 $^{\circ}\text{C}$, 诱导 15 h。

2.2.4 可溶性 ScFv/GST 融合蛋白的亲纯化及其 GST 标签的切除

取 100 mL 诱导表达液,采用谷胱甘肽琼脂糖树脂 Glutathione Sepharose 4B 对可溶 scFv/GST 融合蛋白进行纯化^[14],收集洗脱液,进行 12%SDS-PAGE 检测。确定成功纯化 scFv/GST 融合蛋白后,每毫升蛋白液加入 5 μL (10 单位)的 FactorXa, 25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 6 h 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 用 PBS(pH 7.4)缓冲液透析除去 GST,每隔 4 h 换液。然后将透析后的样品再次经谷胱甘肽琼脂糖树脂 Glutathione Sepharose 4B 进行纯化,收集蛋白液并用 PBS (pH 7.4)定容到 10 mL,采用 Bradford 法测定 scFv 浓度,并通过 12%SDS-PAGE 进行分子量验证^[15]。

2.2.5 Western blotting 鉴定 scFv 抗体

电泳结束后,蛋白条带于电转移至硝酸纤维素膜

(NC 膜)上,室温下将膜在含 2%脱脂奶粉的 PBST(0.01 mol/L PBS, pH 7.4, 0.05%Tween-20)中封闭 1 h 后,加入 HRP/Anti-His 鼠单克隆抗体(1:10000)室温摇动孵育 2 h。PBST 洗膜 3 次,10 min/次。最后加入 DAB 显色液,室温下避光反应 30 s,加入去离子水终止反应,扫描图像。

2.2.6 scFv 抗体效价的测定

采用间接非竞争 ELISA 法测单链抗体 scFv 效价^[16]:包被:包被抗原 Hap1-BSA 用碳酸盐缓冲液稀释至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后包被酶标板,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h;洗涤:200 μL PBST 洗板 3 次(下同);封闭:用含 0.2%脱脂奶粉的 PBST,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;洗涤:加 scFv 单链抗体:将 scFv 用 PBS(pH 7.4)进行 1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200 倍比稀释,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,以 PBST 为阴性对照,以水为空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,各设 3 组重复;洗涤:加酶标二抗:HRP/Anti-His(1:7000 稀释),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 2 h;洗涤;显色:加 TMB 显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 30 min;终止:加 2 mol/L 的硫酸,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$;测定:用酶标仪读取 OD_{450} 值;结果判断:(待测孔 OD_{450} 值-空白对照 OD_{450} 值) \geq (阴性对照 OD_{450} 值-空白对照 OD_{450} 值)的 2.1 倍(即 $P/N \geq 2.1$),判为阳性。

2.2.7 半抗原 Hap1 标准抑制曲线的建立

使用间接竞争 ELISA 的方法测定半抗原 Hap1 的抑制率。间接竞争 ELISA 方法同间接非竞争 ELISA 方法(2.2.6 所述)仅有一步不同,只是将加 scFv 单链抗体更换为等体积的系列浓度的半抗原 Hap1 与单链抗体的预混液。将单链抗体 scFv 用 PBS(pH 7.4)稀释 6400 倍,半抗原 Hap1 用含 5%丙酮、pH 7.4 的 PBS 按照 100、33.33、11.11、3.70、1.24、0.41、0.137、0.045、0.015、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列稀释,与包被抗原竞争结合 scFv,反应结束后在 450 nm 下检测吸光值,每个浓度设 3 组重复。以半抗原浓度对数(LgC)为横坐标,抑制率(见公式 1)为纵坐标,绘制标准曲线。

$$I = (B_0 - B) / B_0 \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

I : 抑制率; B : 加有一定浓度的半抗原测得的 OD_{450} 值; B_0 : 不加半抗原的 OD_{450} 值。

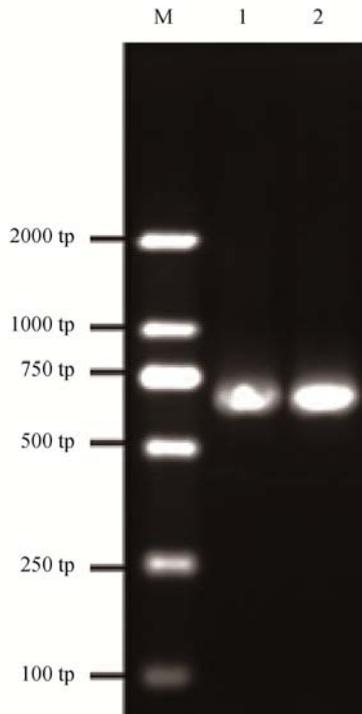
2.2.8 单链抗体 scFv 对不同拟除虫菊酯类农药敏感性的测定

选取 7 种拟除虫菊酯类农药进行抑制率的测定。方法同 2.2.7 所述,只将半抗原换成拟除虫菊酯类农药即可。计算出各种农药的抑制中浓度、回归方程及相关系数(r),并进行列表对比。

3 结果与分析

3.1 重组表达载体的鉴定

重组表达质粒 PCR 鉴定电泳结果见图,由图 1 可以看出,菌液 PCR 可扩增出 730 bp 左右的条带,且测序结果均与预测一致,说明重组表达载体 pET28a(+)-ScFv 和 pET42a(+)-ScFv 构建成功。



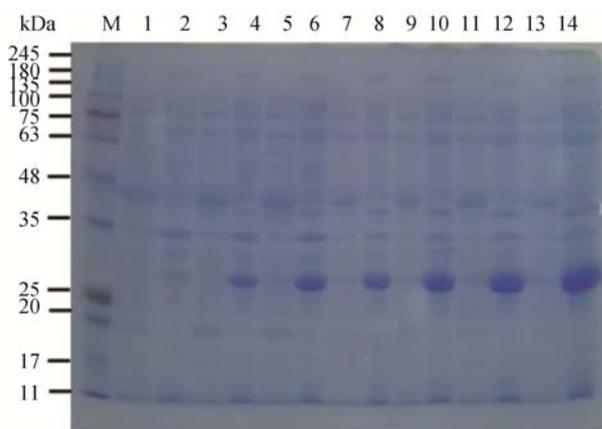
M: DL2000 Marker; 1: pET28a(+)-scFv; 2: pET42a(+)-scFv

图 1 重组表达质粒 PCR 鉴定电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of recombinant expression vector PCR

3.2 pET28a(+)-scFv 的诱导表达和 SDS-PAGE 鉴定

在不同诱导条件下的表达情况如图 2 所示。由结果可以看出, 单链抗体 scFv 约 30 kDa, 与预测相符。不同诱导温度及时间下, 单链抗体基本全部以包涵体形式表达, 且表达量随温度和时间的增加而增加。



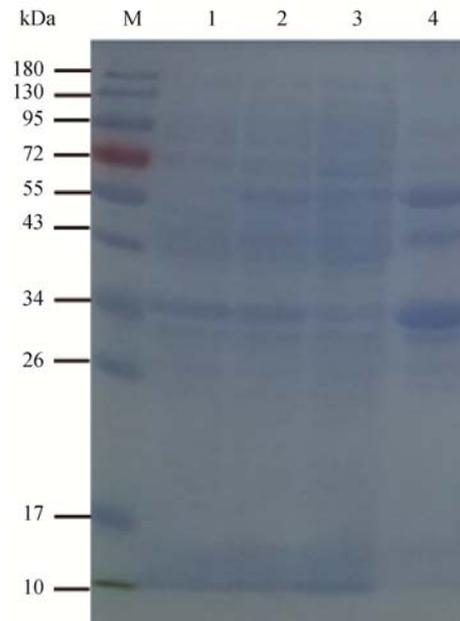
M: 蛋白 Marker; 1、2: 分别为未诱导菌液上清、沉淀; 3、4: 分别为 15 °C 诱导 10 h 上清、沉淀; 5、6: 分别为 15 °C 诱导 15 h 上清、沉淀; 7、8: 分别为 25 °C 诱导 10 h 上清、沉淀; 9、10: 分别为 25 °C 诱导 15 h 上清、沉淀; 11、12: 分别为 30 °C 诱导 10 h 上清、沉淀; 13、14: 分别为 30 °C 诱导 15 h 上清、沉淀

图 2 不同诱导条件下 scFv 的表达情况

Fig. 2 Expressions of scFv under different induction conditions

3.3 pET42a(+)-scFv 的诱导表达形式的鉴定

重组菌 BL21(DE3)-pET42a(+)-scFv 经诱导表达后可使单链抗体的氨基端与分泌蛋白谷胱甘肽 S 转移酶(GST)融合表达, 从而使融合蛋白 scFv/GST 在一定程度上分泌至周质空间, 超声破碎后, 分别收集上清液和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图 3 所示。与未诱导的重组菌相比, 诱导后全蛋白中出现约 68 kDa 蛋白, 分子大小与融合蛋白 scFv/GST 相符, 且部分为上清中可溶表达形式。



M: 蛋白 Marker; 1: 诱导前全组分蛋白; 2: 诱导后全组分蛋白; 3: 诱导后上清; 4: 诱导后沉淀

图 3 scFv/GST 融合蛋白表达形式的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig. 3 Identification result of scFv/GST fusion protein by SDS-PAGE

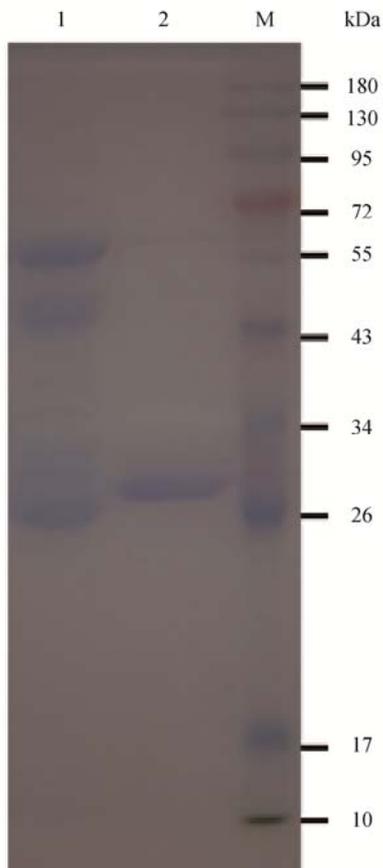
3.4 可溶性 scFv/GST 融合蛋白的亲纯化及其 GST 标签的切除

利用 Glutathione sepharose 4B 对 scFv/GST 融合蛋白的表达上清进行纯化, 对结合在树脂上的 scFv/GST 用含有还原型谷胱甘肽的洗脱缓冲液洗脱。SDS-PAGE 分析洗脱液成分, 在相对分子质量约 68 kDa 处可见与 scFv/GST 融合蛋白大小相符的条带(图 4)。但在 50、25 kDa 处也有明显条带, 分析可能是非特异性结合在谷胱甘肽琼脂柱上的非目的蛋白。将纯化后的 scFv/GST 进行 GST 标签的切除, 测定蛋白浓度为 6.81 mg/L, 由于诱导上清在纯化后浓度提高了 10 倍, 因此可溶性 scFv 的表达水平应为 0.681 mg/L。经 SDS-PAGE 分析 scFv 单链抗体约为 30 kDa, 与预计相符。

3.5 Western blotting 鉴定 scFv 单链抗体

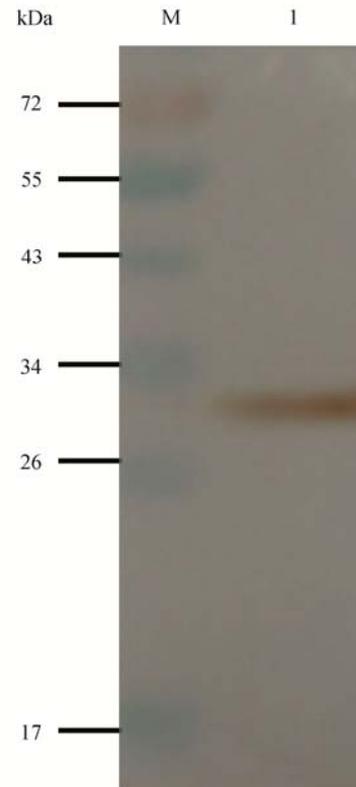
scFv 单链抗体的 C 端有 6×His 标签, 因此可以用

HRP/Anti-His 鼠单克隆抗体进行初步检测, 结果如图 5。显色后的 NC 膜上 1 号泳道中只显示一条带, 大小约为 30 kDa, 说明可溶性融合蛋白 scFv/GST 切除标签后成功获得目的单链抗体 scFv。



1: 纯化后的 scFv/GST; 2: 切除标签的 scFv; M: 蛋白 Marker
图 4 纯化的可溶性 scFv/GST 融合蛋白及切除 GST 标签的 scFvde SDS-PAGE 结果

Fig. 4 SDS-PAGE result of purified soluble scFv/GST fusion protein and its GST-Tagresection



M: 低分子量 Marker; 1: scFv 单链抗体
图 5 scFv 单链抗体 Western blotting 结果
Fig. 5 Western blotting result of scFv

3.6 单链抗体 scFv 效价的测定

抗体的效价是指抗体稀释时能与抗原发生反应时的最高稀释度, 它反映有效抗体的浓度。采用间接非竞争 ELISA 法测定了不同稀释倍数下单链抗体 scFv 的效价, OD_{450} 和 P/N 结果见表 2。由结果可知, 单链抗体的终点效价为 1:25600。

表 2 scFv 对半抗原 Hap1 效价测定结果
Table 2 Titer results of scFv to Hap1

	阴性对照	空白对照	scFv 稀释倍数							
			400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200
OD_{450}	0.21	0.04	2.44	2.15	1.68	1.45	1.11	1.09	0.68	0.31
P/N			14.11	12.41	9.64	8.29	6.29	6.17	3.76	1.58

注: P =待测孔 OD_{450} 值-空白对照 OD_{450} 值; N =阴性对照 OD_{450} 值-空白对照 OD_{450} 值。

3.7 半抗原 Hap1 标准抑制曲线的建立

以 hap1 浓度的对数为横坐标, 3 组抑制率平均值为纵坐标绘制抑制曲线, 结果见图 6。由此可以看出, 半抗原 Hap1 对 scFv 的抑制呈“S”曲线, 对此抑制曲线求线性区间的回归方程为 $I=21.577\text{Log}C+41.68$, $r=0.996$, 计算 IC_{50} 为 $2.43 \mu\text{g/mL}$, 线性检测范围为 $0.045\sim 33.33 \mu\text{g/mL}$, 由于 IC_{10} 不在线性区间内, 因此最低检测限为 $0.045 \mu\text{g/mL}$ 。

3.8 单链抗体 scFv 对不同拟除虫菊酯类农药特异性的测定

7 种拟除虫菊酯类农药的化学结构式、抑制中浓度、回归方程及相关系数见表 3。由结果可知, 单链抗体对氯菊酯、氰菊酯、溴氰菊酯均有较强的识别能力, 对联苯菊酯、氰戊菊酯、氟胺氰菊酯有中等强度的识别能力, 而对

醚菊酯基本无识别能力。

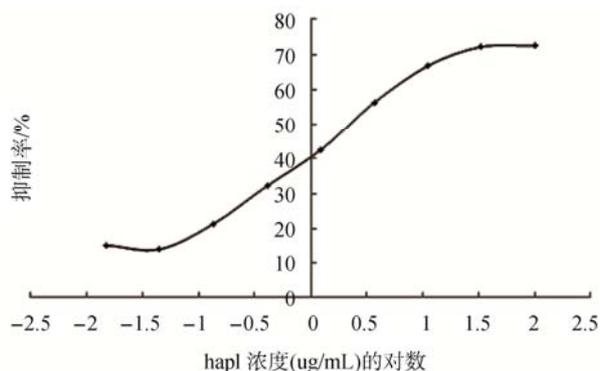


图 6 半抗原 Hap1 对单链抗体 scFv 的抑制曲线
Fig. 6 Inhibiting curve of Hap1 to scFv

表 3 单链抗体对不同拟除虫菊酯类农药的特异性
Table 3 The specificity of scFv to different pyrethroids

农药	化学结构式	$IC_{50}(\mu\text{g/mL})$	竞争曲线方程	相关系数
氯菊酯 permethrin		3.29	$I=20.81\text{Log}C+39.24$	$r=0.9925$
氰菊酯 cypermethrin		4.72	$I=23.99\text{Log}C+33.82$	$r=0.9904$
溴氰菊酯 deltamethrin		5.55	$I=24.42\text{Log}C+31.83$	$r=0.9926$
联苯菊酯 bifenthrin		11.25	$I=23.21\text{Log}C+25.6$	$r=0.9931$
氰戊菊酯 fenvalerate		26.30	$I=24.8\text{Log}C+14.68$	$r=0.9903$
氟胺氰菊酯 fluvalinate		37.15	$I=22.41\text{Log}C+14.89$	$r=0.9908$
醚菊酯 etofenprox		>100	-	-

4 讨论与结论

本研究构建2种重组表达载体,探索中发现在利用重组载体 pET-28a(+)-scFv 表达单链抗体时,即使使用低温低诱导剂浓度的方法也无法获得可观的可溶性抗体,分析原因是由于外源基因在大肠杆菌中表达时,无细菌信号肽序列并使用了 T7 强启动子使表达产物在细胞浆内大量沉积无法正确折叠,形成不溶性包涵体。包涵体只具有抗体分子的一级结构,没有抗原结合功能,必须经过复杂的变性、复性才有可能获得活性抗体。课题组又尝试采用重组载体 pET-42a(+)-scFv,使单链抗体氨基端与具有增加蛋白可溶性功能的 GST 融合表达,实现了融合蛋白 scFv/GST 部分可溶形式的表达,对纯化后的 scFv/GST 融合蛋白利用 Factor Xa 切割 GST 标签成功获得了单独的单链抗体 scFv,经检测对同源半抗原 hap1 的效价高达 1:25600。

目前报道的拟除虫菊酯类农药广谱性抗体均为多克隆抗体和单克隆抗体。例如骆爱兰等^[6]以 PBA 为半抗原,制备出拟除虫菊酯类农药的广谱性多克隆抗体,能识别氯菊酯、甲氰菊酯、三氟氯菊酯、溴氰菊酯,其 IC₅₀ 约 4 μg/mL;徐敦明等^[9]以商品化的 PBA 为半抗原(不需任何化学修饰)制备拟除虫菊酯类农药的单克隆抗体,对溴氰菊酯、甲体氯氰菊酯、甲氰菊酯、氰戊菊酯均有特异性识别,IC₅₀ 分别为 0.79、0.74、0.63 和 0.80 μg/mL。本研究利用半抗原 Hap1 制备基因工程单链抗体 scFv,对氯菊酯、氯氰菊酯和溴氰菊酯均有特异性识别能力,IC₅₀ 分别为 3.29、4.72 和 5.55 μg/mL,与多克隆抗体识别能力相当,但没有单克隆抗体灵敏度高。分析原因可能是外源重组抗体在宿主细胞中没有进行翻译后的糖基化和磷酸化修饰、不能完成二硫键和多聚体的组成、稳定性相对较差等因素造成的^[17]。本课题组将进一步通过替换 scFv 的表达载体和替换表达系统,以及通过错配 PCR、DNA 改组和链置换等抗体亲和力成熟策略提高单链抗体与抗原结合活性^[11],以提高实际检测应用价值。

参考文献

- [1] 胡春容,李君.拟除虫菊酯类农药的毒性研究进展[J].毒理学杂志,2005,19(3):239-241.
Hu CR, Li J. Research progress on toxicity of pyrethroid pesticides [J]. J Toxicol, 2005, 19(3): 239-241.
- [2] 刘运龙,陈睿,李炜.拟除虫菊酯类农药残留快速检测技术研究进展[J].广西农业科学,2010,41(10):1076-1087.
Liu YL, Chen R, Li W. Advances in rapid determination of pyrethroid pesticide residues [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(10): 1076-1087.
- [3] GB2673-2012 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量 [S].
GB2673-2012 National Food Safety Standard-Maximum residue limits for pesticides in food [S].
- [4] Takaho W, Shan GM, Donald WS, et al. Development of a class-specific immunoassay for the type I pyrethroid insecticides [J]. Anal Chim Acta, 2001, 444(1): 119-129.
- [5] Sally KM, Shan GM, Lee HJT, et al. Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides [J]. Anal Chim Acta, 2005, 534(1): 109-120.
- [6] 骆爱兰,余向阳,张存正,等.拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的建立[J].中国农业科学,2005,38(2):308-312.
Luo AL, Yu XY, Zhang C, et al. Development of enzyme immunoassays for pyrethroids [J]. Sci Agric Sin, 2005, 38(2): 308-312.
- [7] Kong Y, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for the pyrethroidinsecticide delta-methrin [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(14): 8189-8195.
- [8] Chen XJ, Xu LG, Ma W, et al. General immunoassay for pyrethroids based on a monoclonal antibody [J]. Food Agric Immunol, 2014, 25(3): 341-349.
- [9] 徐敦明,卢声宇,周昱,等.拟除虫菊酯类农药单克隆抗体的制备及鉴定[J].福建分析学报,2010,4(4):5-9.
Xu DM, Lu SY, Zhou Y, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies of pyrethroid pesticides [J]. Fujian Anal Test, 2010, 4(4): 5-9.
- [10] 徐重新,张存政,张霄,等.人源化抗 Cry1B 毒素蛋白单链抗体的原核表达及生物学活性测定[J].南京农业大学学报,2013,36(3):47-52.
Xu CX, Zhang CZ, Zhang X, et al. Prokaryotic expression and biological activity determination of humanized anti-Cry1B toxin protein single-chain [J]. J Nanjing Agric Univ, 2013, 36(3): 47-52.
- [11] 王东方.拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2015.
Wang DF. Study of multi-residue immunoassay for pyrethroid insecticides [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2015.
- [12] Sonoda H, Kumada Y, Katsuda T, et al. Functional expression of single-chain antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli* by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones [J]. Protein Express Purif, 2010, 70(2): 248-253.
- [13] Jurado P, Ritz D, Beckwith J, et al. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. J Mol Biol, 2002, 320(1): 1-10.
- [14] 姜茵,奚月,李妍.幽门杆菌 Catalase/GST 融合蛋白的表达、标签切除及鉴定[J].生物技术通报,2013,41(2):102-105.
Jiang Y, Xi Y, Li Y. Expression, labeling and identification of catalase/GST fusion protein of *Helicobacter Pylori* [J]. Biotechnol Bull, 2013, 41(2): 102-105.
- [15] 科林根.精编蛋白质科学实验指南(李慎涛等译)[M].北京:科学出版社,2007.
Coligan JE. Short protocols in protein science (Trans Li ST, et al) [M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [16] 周斌,石德时,覃雅丽,等.氯霉素间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2000,29(2):122-126.
Zhou B, Shi DS, Tan YL, et al. Establishment of indirect competitive

ELISA for detection of chloramphenicol [J]. Chin J Prev Vet Med, 2000, 29(2): 122-126.

[17] 邓亮, 舒建昌. 单链抗体表达研究进展[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(2): 321-322.

Deng L, Shu JC. Advances in the research of single-chain antibodyexpression [J]. J Pract Med, 2009, 25(2): 321-322.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



吴元元, 硕士, 主要研究方向为农药免疫分析。

E-mail: wuyy0115@163.com



祁志军, 副教授, 主要研究方向为新农药研究与开发及农药免疫分析。

E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn

《食品掺假与食物中毒专题》征稿函

民以食为天, 保障食品健康安全是政府监管部门的职责, 国家已不断加强了对食品安全的监管力度, 但“暴利之下必有勇夫”, 一些食品经营企业或个体以掺假、掺杂、伪造等手法达到非法牟利目的, 食品安全事故频频出现。另外, 食物中毒是一类经常发生的疾病, 会对人体健康和生命造成严重损害。

鉴于此, 本刊特别策划了“**食品掺假与食物中毒专题**”专题, 由中国检验检疫科学研究院副院长陈颖研究员担任专题主编。专题将围绕**(1)基因组学、代谢组学、脂质组学、蛋白组学等食品组学方法在食品掺伪鉴别中的应用; (2)无损检测在食品掺伪和品质鉴定中的应用; (2)食物掺假的应对策略、食品掺假管理; (3)食物中毒原因筛查、防控相关技术和方法或您认为本领域有意义的问题**展开讨论, 计划在**2017年5月**出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在**2017年4月1日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部