

鲨鱼单域抗体融合蛋白的克隆表达、稳定性及检测性能研究

贾成雨, 刘畅, 林洪, 曹立民, 王凯强, 隋建新*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266110)

摘要: **目的** 探究鲨鱼单域抗体融合蛋白的克隆表达及其性能。**方法** 通过大肠杆菌表达系统高效表达鲨鱼单域抗体融合蛋白 2E6-SUMO; 以传统的免疫球蛋白 G (immolunoglobulin G, IgG) 抗体为对照, 对其热稳定性及酸碱稳定性进行研究; 并以 2E6-SUMO 为识别元件, 建立间接竞争酶联免疫吸附法, 并应用于水产品中恩诺沙星残留的检测。**结果** 2E6-SUMO 的可溶性表达量为 1.67 mg/L, 与传统的 IgG 抗体相比, 2E6-SUMO 具有更好的热稳定性和酸碱稳定性; 建立了基于 2E6-SUMO 检测恩诺沙星的间接竞争酶联免疫吸附法, 半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 42.08 ng/mL, 检出限为 3.84 ng/mL, 线性范围为 9.94~376.17 ng/mL; 鱼肉基质对 2E6-SUMO 没有显著干扰, 加标样品的回收率在 83.33%~123.06% 之间。**结论** 鲨鱼单域抗体融合蛋白实现了高效表达, 表现出更好的稳定性, 可作为一种新型特异性免疫元件用于水产品中药物残留的免疫检测。本研究为鲨鱼单域抗体融合蛋白的应用提供了参考。

关键词: 单域抗体; 恩诺沙星; 稳定性; 酶联免疫吸附法; 水产品

Study on the cloning, expression, stability and detection performance of shark-derived single domain antibody fusion proteins

JIA Cheng-Yu, LIU Chang, LIN Hong, CAO Li-Min, WANG Kai-Qiang, SUI Jian-Xin*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266110, China)

ABSTRACT: Objective To explore the cloning, expression and performance of shark single domain antibody fusion proteins. **Methods** Shark-derived single domain antibody fusion protein 2E6-SUMO was efficiently expressed by *Escherichia coli* expression system; its thermal and acid-base stability was investigated using conventional immolunoglobulin G (IgG) antibody as a control, and constructed an indirect competition enzyme-linked immunosorbent assay using 2E6-SUMO as the recognition element, and applied it to the detection of enrofloxacin residues in aquatic products. **Results** The soluble expression level of 2E6-SUMO was 1.67 mg/L, and the 2E6-SUMO had better thermal and acid-base stability compared with the traditional IgG antibody, indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on 2E6-SUMO for the detection of enrofloxacin was developed with an half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of 42.08 ng/mL, the limit of detection was 3.84 ng/mL, with a

基金项目: 国家自然科学基金项目(32072308)、中央高校基本科研业务费项目(202042011)、山东省重点研发计划项目(2023CXGC010709)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32072308), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (202042011), and the Key Research and Development Program of Shandong Province, China (2023CXGC010709)

*通信作者: 隋建新, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品安全与质量控制。E-mail: suijianxin@ouc.edu.cn

*Corresponding author: SUI Jian-Xin, Ph.D, Professor, Ocean University of China, No.1299, Sansha Road, Huangdao District, Qingdao 266110, China. E-mail: suijianxin@ouc.edu.cn

linear range of 9.94–376.17 ng/mL; and the experiments showed that the fish matrix did not significantly interfere with 2E6-SUMO, and the recoveries of spiked samples ranged from 83.33% to 123.06%. **Conclusion** The shark-derived domain antibody fusion protein achieve efficient expression, shows better stability, and can be used as a novel specific immolune element for immunodetection of drug residues in aquatic products. This study provides a reference for the application of shark-derived single domain antibody fusion protein.

KEY WORDS: single domain antibodies; enrofloxacin; stability; enzyme-linked immunosorbent assay; aquatic products

0 引言

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是一种以抗原抗体相互作用为基础的分析检测方法^[1],具有快速、简便、特异性强和灵敏度高等优点,已经被广泛应用于农药、兽药和真菌毒素等污染物的快速检测^[2-4]。然而,ELISA中常用的多克隆抗体和单克隆抗体制备复杂、耗时且稳定性差,不适用于一些复杂的环境和基质^[5-6],这些不足影响了ELISA技术的应用。因此,开发新的免疫试剂是非常必要的。

单域抗体(single-domain antibodies, sdAbs)是从骆驼科动物和软骨鱼血清中克隆得到,由抗体或新抗原受体单一可变结构域构成的具有抗原结合活性的基因工程抗体^[7-8]。与传统免疫球蛋白 G (immolunoglobulin G, IgG)抗体相比, sdAbs 具有分子量低、亲和力强、稳定性好、抗干扰性强等显著优点^[9-10]。sdAbs 在免疫检测中有着更加广泛的应用,许多研究也报道了基于 sdAbs 的检测食品、环境中小分子有害物质如氟虫腈、西维因、赭曲霉毒素 A、蓖麻毒素等间接竞争酶联免疫吸附法(indirect competition enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA)^[11-14]。因此基于 sdAbs 的优势,其作为一种新型免疫元件可以用于解决 ELISA 在检测中使用传统抗体存在的问题,拓展 ELISA 的应用范围。

作为一种基因工程抗体,单结构域抗体已在真核、原核和细胞表达系统中成功表达^[15-16]。但需要注意的是,在原核表达系统中表达的单域抗体通常以包涵体的形式存在,在变性和复性过程中,表达的抗体的活性会大大降低,并且表达量通常较低,这限制了其在小分子危害物检测中的应用^[17-18]。而融合蛋白的表达可以促进蛋白质的正确折叠,增加靶蛋白在细胞质中的可溶性,谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)、麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)、小泛素相关修饰蛋白(small ubiquitin-related modifier, SUMO)在先前的研究中已被用作单域抗体表达中的融合标签蛋白^[19-21]。并且一些研究表明,构建的融合蛋白系统实现了抗体的高效表达并可应用于免疫检测^[22-23]。因此,本研究将使用 SUMO 标签蛋白与目标单域抗体进行融合表达,以获得高活性、高产率的单域抗体融合蛋白作为免疫元件。

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)是第三代喹诺酮类抗菌药,由于其广泛的抗菌活性,它已被广泛用于预防和治疗动物疾病,但 ENR 的滥用对人类健康和生态环境带来了不利影响,对其的检测也十分重要^[24-26]。本实验室已经构建了表达 2E6 *ssdAb* 基因(识别 ENR)的 pET28aSUMO 可溶性异源表达系统。本研究拟通过已有的表达系统实现 2E6-SUMO 单域抗体融合蛋白的高效表达,探究 2E6-SUMO 的热稳定性和酸碱稳定性,以 2E6-SUMO 为免疫元件建立 ENR ic-ELISA 并应用于实际样品检测,为单域抗体及其融合蛋白在 ELISA 中的应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

恩诺沙星阴性鱼类样品大菱鲂、大黄鱼和鲈鱼(中国水产科学研究院黄海水产研究所)。

LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基(北京陆桥技术有限责任公司);磷酸盐缓冲液((phosphate buffered solution, PBS)、碳酸盐缓冲液(carbonate buffer solution, CBS)、3,3',5'-N,N' 四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB, 纯度>99%)、吐温 20(纯度>98%)、异丙基- β -D-1-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG, 纯度>98%)、卡那霉素、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶试剂盒、鼠抗 His 标签 IgG、辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记羊抗鼠 IgG(北京索莱宝科技有限公司);脱脂奶粉(纯度>90%,德国 Einhausen Biofroxx 有限公司);恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、氧氟沙星、达氟沙星、沙拉沙星(纯度>98%,上海阿拉丁生化科技有限公司);硫酸钠、氯化钠、咪唑、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl) aminoethane, Tris]、乙酸、乙腈(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

BCE224-1CCN 电子天平[精度为 0.0001 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];MLS-3750 高压蒸汽灭菌锅(日本 SANY 公司);HZQ-F280 全温振荡培养箱(太仓市华美生化仪器厂);UH-12 型高压细胞破碎机[永联生物科技(上海)有限公司];ChemiDocXRS+凝胶成像系统(上海伯乐生命

医学产品有限公司); CMax Plus 微孔板酶标仪(上海美谷分子仪器); 3k15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 2E6-SUMO 融合蛋白的表达和纯化

将带有重组质粒 pET28a-SUMO-2E6 的表达菌株大肠杆菌 BL21 (DE3) 均匀涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 倒置培养 12 h; 挑取单菌落接入 5 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37°C、220 r/min 振荡培养 12 h; 按 1:100 的比例将上述培养物转接至含有 50 μg/mL 卡那霉素的新 LB 液体培养基中, 37°C、220 r/min 振荡培养至对数期($OD_{600}=0.4\sim0.6$); 在达到对数期后, 向培养液中加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 并在 16°C 下培养 18 h。收集菌液并于 4000×g 下离心 20 min 收集菌体沉淀, 用缓冲液(50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl)复溶菌体。使用高压破碎机, 在高压(8×10^7 Pa)条件下破碎细胞。将破碎后的细胞于 9000×g 下离心 40 min 后收集上清液, 并用 0.45 μm 无菌过滤器除菌, 回收含有带 SUMO 标签的可溶性融合蛋白 2E6 (2E6-SUMO 融合蛋白)的溶液。将回收液上样到 Ni-亲和和层析柱中, 用 5~10 倍柱体积的结合缓冲液(50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0)冲洗柱子, 再用不同咪唑浓度(20、50、100、200 和 500 mmol/L, 溶于结合缓冲液中)的洗脱液洗脱纯化带有 6XHis 标签的 2E6-SUMO 融合蛋白, 收集各组分离脱液。所有洗脱液均使用 12% SDS-PAGE 进行验证。最后收集纯化的 2E6-SUMO 融合蛋白, 于 4°C 过夜透析后在 -20°C 条件下存储备用。

1.3.2 2E6-SUMO 的热稳定性和酸碱稳定性分析

以传统兔抗 IgG 为对照, 将未处理抗体的抗原结合活性作为 100%, 采用间接 ELISA 分析 2E6-SUMO 的热稳定性和酸碱稳定性。将 2E6-SUMO 和 IgG 稀释至工作浓度并分成两份, 一份分别放入 25、37、45、60、75 和 90°C 的水浴中加热 5 min, 另一份放入 75°C 的水浴中, 分别加热 0、5、15、30、45 和 60 min, 加热后将抗体恢复到室温以待检测; 将 2E6-SUMO 和 IgG 使不同 pH (1.0、3.0、5.0、7.4、9.0、11.0、13.0)的 PBS 稀释至工作浓度, 孵育 2 h 后再调至中性, 用间接 ELISA 测定 2E6-SUMO 和兔抗 IgG 与抗原的结合活性变化。

1.3.3 基于 2E6-SUMO 的 ENR ic-ELISA 方法构建

制备 ENR [1 mg/mL, 溶于 0.03% (*m/V*) NaOH]储备液, 用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)逐次稀释至所需浓度。首先, 将 100 μL 1 μg/mL ENR-OVA 包被抗原[用 CBS (0.05 mol/L, pH 9.6)稀释]加入到 96 孔板中, 在 4°C 下孵育过夜, 用 300 μL 的含有 0.05% (*V/V*) Tween 20 的 PBS [PBS containing 0.05% (*V/V*) Tween 20, PBST]洗涤 3 次。每孔添加 300 μL 含有 5% (*m/V*)脱脂奶粉的 PBST [PBST containing 5% (*m/V*) skimmed milk powder, mPBST], 在 37°C 条件下封闭 2 h, 并用 PBST 缓冲液洗涤 3 次。将 2E6-SUMO 与不同浓度的

ENR 溶液按 1:1 (*V/V*)的比例充分混合, 并用 PBST 缓冲液洗涤 3 次。每孔加入 100 μL 鼠抗 His 标签 IgG, 然后在 37°C 下孵育 45 min, 并用 PBST 缓冲液洗涤 3 次。每孔加入 100 μL HRP-羊抗鼠 IgG, 在 37°C 下孵育 45 min, 并用 PBST 缓冲液洗涤 3 次。在每个孔中加入 100 μL TMB 显色液, 使其在 37°C 黑暗中反应 15 min, 然后加入 50 μL 终止液(2.0 mol/L H₂SO₄)停止反应。使用 CMax Plus 微孔板酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。绘制竞争抑制标准曲线, 并按公式(1)计算抑制率, 其中 B_0 为不加 2E6-SUMO 孔的 OD_{450} , B 为加入 2E6-SUMO 孔的 OD_{450} 。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.4 2E6-SUMO 的特异性评价

选取 ENR 结构类似物, 环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、达氟沙星、沙拉沙星和氧氟沙星 6 种氟喹诺酮类药物进行了特异性评价, 方法同 1.3.3, 计算交叉反应率 (cross reactivity, CR), 公式见(2)。

$$\text{CR}/\% = \frac{IC_{50}(\text{ENR})}{IC_{50}(\text{其他结构类似物})} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 基质效应评价

制备和提取样品的步骤如下: 分别称取 1.0 g ENR 阴性的鱼类样品(大菱鲆、大黄鱼和鲈鱼), 向试管中加入 2 mL 含有 1% (*V/V*)乙酸的乙腈溶液, 涡旋 1 min。将上述混合溶液在 6000 r/min 下均质 5 min, 在 3600×g 转速下离心 5 min, 得到上清液, 重复提取过程, 收集上清液。向每个试管加入 0.6 g 硫酸钠进行脱水。然后将上清液转移到新的离心管中, 在 50°C 条件下氮气吹干, 并用 1 mL 0.01 mmol/L PBS (pH 7.4)复溶, 使用 0.22 μm 滤膜对溶液进行过滤用于分析。通过间接 ELISA 比较对照组(OD_{450} 对照)和实验组(OD_{450} 实验)的吸光值来分析基质效应^[27], 评价指标为基质干扰指数(I_m), 计算方法为公式(3):

$$I_m/\% = \frac{OD_{450\text{实验}} - OD_{450\text{对照}}}{OD_{450\text{对照}}} \times 100\% \quad (3)$$

其中 OD_{450} 对照 为使用空白对照进行间接 ELISA 实验得出的 450 nm 吸光值, OD_{450} 实验 为使用不同样品溶液进行间接 ELISA 实验得出的 450 nm 吸光值。

1.3.6 实际样品中 ENR 加标回收实验

称取 1.0 g ENR 阴性的鱼类样品(大菱鲆、大黄鱼和鲈鱼), 并分别转移到含不同浓度 ENR 的 5 mL 离心管中, 在 4°C 下孵育 16 h, 其余同 1.3.5。样品加标终浓度为 100、500、1000 μg/kg。计算添加回收率和批内变异系数。

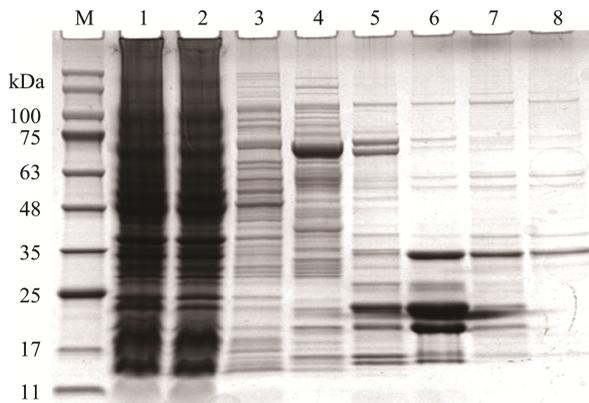
1.4 数据处理

实验所有处理重复 3 次, 采用 Origin 9.0 软件进行数据分析及作图。

2 结果与分析

2.1 2E6-SUMO 融合蛋白的表达与纯化

2E6-SUMO 融合蛋白的分子量约为 34.6 kDa, 其中包括目标蛋白 2E6 (12.9 kDa) 和 SUMO 标签蛋白 (21.7 kDa)。不同咪唑浓度的洗脱液均通过 SDS-PAGE 鉴定。如图 1 所示, 在 35 kDa 附近发现目的条带, 其中 500 mmol/L 咪唑的洗脱液中大部分都是所需的 2E6-SUMO 融合蛋白, 纯度能达到 90% 左右。经计算得, 1 L 发酵液可以纯化得到 1.67 mg 的可溶性 2E6-SUMO 融合蛋白, 实现了高产量表达。



注: 泳道 M 为标准蛋白, 泳道 1 为回收液, 泳道 2 为流出液, 泳道 3 为 binding buffer, 泳道 4 为 20 mmol/L 咪唑洗脱液, 泳道 5 为 50 mmol/L 咪唑洗脱液, 泳道 6 为 100 mmol/L 咪唑洗脱液, 泳道 7 为 200 mmol/L 咪唑洗脱液, 泳道 8 为 500 mmol/L 咪唑洗脱液。

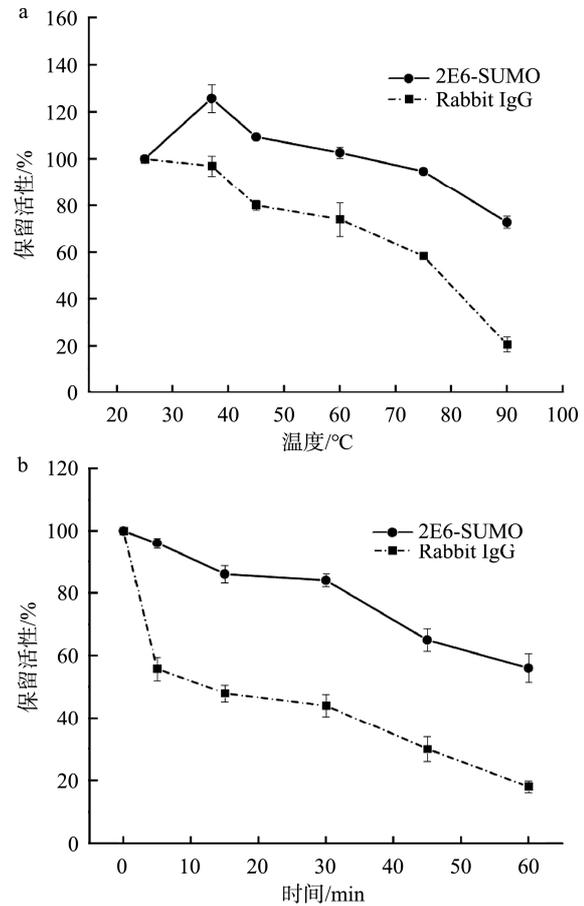
图 1 2E6-SUMO 融合蛋白纯化 SDS-PAGE 图

Fig.1 SDS-PAGE image of purified 2E6-SUMO

2.2 2E6-SUMO 的稳定性

通过间接 ELISA 比较融合蛋白 2E6-SUMO 和传统兔抗 IgG 在不同加热温度、不同加热时间以及不同 pH 条件下的抗原结合活性变化。如图 2a 所示, 在相同加热温度下, 2E6-SUMO 的抗原结合能力高于传统的 IgG, 当温度达到 90°C 时, 2E6-SUMO 的保留活性仍在 70% 左右, 而传统 IgG 抗体几乎丧失了活性。如图 2b 所示, 在 75°C 条件下加热时, 2E6-SUMO 和 IgG 抗体都出现了活性随加热时间延长而下降的现象, 但与 IgG 抗体相比, 2E6-SUMO 即使加热到 60 min, 其结合能力仍能保持在 50% 以上 (图 2b)。一方面, 2E6-SUMO 的高热稳定性可能是由于单域抗体其独特的结构域, 其结构中含有非经典半胱氨酸并形成二硫键, 使其在加热时稳定性更强; 另一方面, 融合蛋白中两个蛋白分子的相互作用增强了蛋白的折叠性能, 从而提高抗体的热稳定性^[28-30]。如图 3 所示, 在酸碱稳定性测定中, 2E6-SUMO 与抗体 IgG 的生物保留活性都表现出随着 pH 升高而先升高后下降的相似趋势, 在 pH 为 5 时, 2E6-SUMO 的抗原结合活性提高了约 60%, 这可能与单域抗体的重折叠特性有关^[20]。从总体上看, 2E6-SUMO 的酸

碱稳定性要显著高于传统抗体 IgG。热稳定性和酸碱稳定性强的 2E6-SUMO 相比于传统抗体有更广阔的应用范围。



注: a 为不同温度下处理 5 min 后保留的抗原结合能力对比结果;

b 为 75°C 下处理不同时间后保留的抗原结合能力对比结果。

图 2 温度对 2E6-SUMO 和 IgG 的抗原结合能力影响

Fig.2 Effects of temperature on antigen binding ability of 2E6-SUMO and IgG

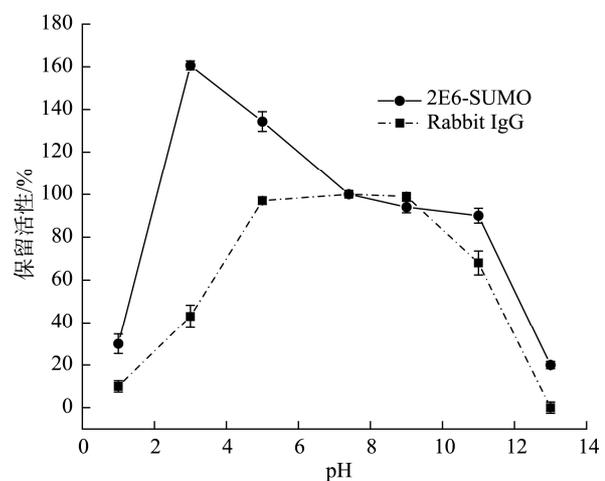


图 3 pH 对 2E6-SUMO 和 IgG 的抗原结合能力影响

Fig.3 Effects of pH on the antigen binding ability of 2E6-SUMO and IgG

2.3 基于 2E6-SUMO 的 ENR ic-ELISA 构建

通过棋盘标定确定 2E6-SUMO 和包被原的工作质量浓度分别是 0.1 mg/mL 和 1 μg/mL, 建立了基于 2E6-SUMO 的 ENR ic-ELISA 方法。如图 4 所示, IC₅₀ 为 42.08 ng/mL, 检出限为 3.84 ng/mL, 检测线性范围在 9.94~376.17 ng/mL 之间, 并且满足我国国家标准对水产品中 ENR 的检测需求。

2.4 2E6-SUMO 的特异性评价

使用 ic-ELISA 测定 2E6-SUMO 对其他 ENR 结构类似物的交叉反应率, 以此来评价 2E6-SUMO 的特异性。如表 1 中所示, 2E6-SUMO 对环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星和培氟沙星的 IC₅₀ 分别为 8.36、10.39、11.31、15.20 和 17.15 μg/mL, 交叉反应率分别为 0.50%、0.41%、0.37%、0.28% 和 0.25%。此外, 2E6-SUMO 对诺氟沙星的交叉反应率小于 0.1%, 表明 2E6-SUMO 具有良好的特异性。

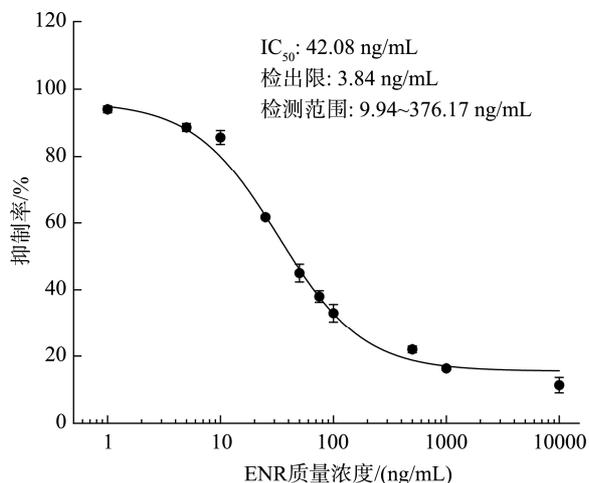
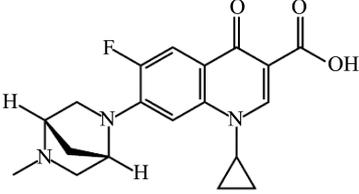
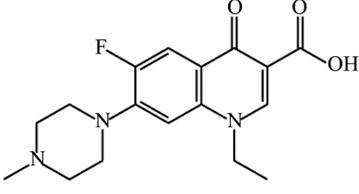
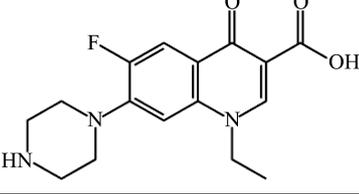


图 4 间接竞争抑制曲线
Fig.4 Indirect competitive inhibition curve

表 1 交叉反应率结果
Table 1 Cross-reactivity results

名称	化学结构	IC ₅₀ /(μg/mL)	交叉反应率/%
ENR		0.042	100.00
环丙沙星		8.36	0.50
氧氟沙星		10.39	0.41
沙拉沙星		11.31	0.37

表 1(续)

名称	化学结构	IC ₅₀ /(μg/mL)	交叉反应率/%
达氟沙星		15.20	0.28
培氟沙星		17.15	0.25
诺氟沙星		412.15	<0.1

2.5 基质效应评价

以往的研究表明, 基质成分, 特别是鱼类和其他动物源性食品中的蛋白质, 会对免疫测定产生显著的基质效应, 免疫测定的准确性会受到样品基质的影响^[31-33]。如图 5 所示, 在 3 种海水鱼样品中, 2E6-SUMO 融合蛋白在 450 nm 处的吸光度与对照组接近, Im 分别为 3.67%±2.68%、3.31%±4.19%和 6.85%±4.54%, 均小于 10%。这一结果清楚地表明, 鱼肉基质不会严重干扰 2E6-SUMO 对 ENR 的识别, 也不会造成严重的假阳性或假阴性的免疫测定结果。

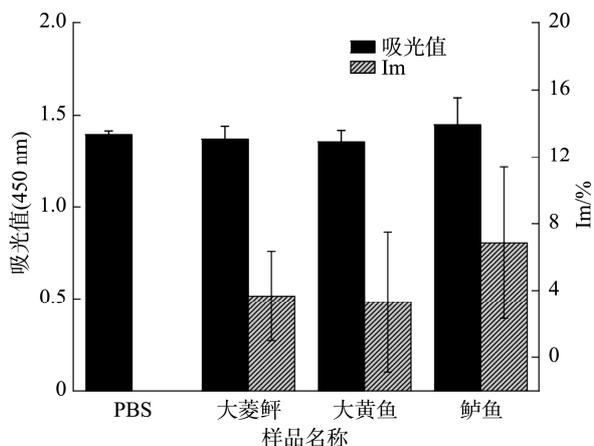


图 5 ENR 阴性鱼肉提取液 ELISA 吸光值和 Im 值
Fig.5 ELISA absorbance and Im values of ENR-negative fish extract

2.6 实际样品中 ENR 加标回收实验

通过 ENR 加标回收实验评价所建立方法在实际样品中的准确度和稳定性。实验室之前的研究已经证实, 本研究采用的鱼类样品前处理方法可以有效地从样品中提取加标的 ENR 用于检测。如表 2 所示, 在 3 种鱼类样品中, ENR 的加标回收率在 83.33%~123.06%之间, 变异系数在 1.86%~11.93%之间。综上所述, 本研究建立的基于 2E6-SUMO 的 ENR ic-ELISA 具有良好的稳定性和准确性, 可用于水产品中 ENR 残留的检测。

表 2 不同样品的加标回收率
Table 2 Spiked recoveries of different samples

样品	加标浓度/(μg/kg)	测定浓度/(μg/kg)	回收率/% (n=3)	变异系数/%
大菱鲆	50	50.83±0.94	101.60	1.86
	250	223.91±24.11	89.53	9.59
	500	416.65±23.15	83.33	4.63
大黄鱼	50	48.37±1.88	96.51	3.57
	250	241.85±19.13	93.30	7.63
	500	531.55±59.65	106.31	11.93
鲈鱼	50	54.74±0.42	109.32	0.73
	250	245.45±20.75	98.18	8.30
	500	615.00±51.00	123.06	10.20

3 讨论与结论

本研究高效表达并纯化了 ENR 特异性的鲨鱼源单域抗体融合蛋白 2E6-SUMO, 探究了 2E6-SUMO 的热稳定性和酸碱稳定性, 建立了基于 2E6-SUMO 的 ENR ic-ELISA 方法, 并应用在实际海水鱼样品中。结果表明, 相比于传统 IgG 抗体, 2E6-SUMO 具有更强热稳定性和酸碱稳定性, 所建立 ENR ic-ELISA 的 IC_{50} 为 42.08 ng/mL, 检出限为 3.84 ng/mL, 对其他喹诺酮类药物的交叉反应率均低于 1%, 特异性良好。3 种海水鱼样品的 I_m 低于 10%, 说明没有显著的基质效应, 在加标回收实验中, 回收率在 83.33%~123.06%之间, 变异系数在 1.86%~11.93%之间。总之, 本研究所表达的单域抗体融合蛋白 2E6-SUMO 制备简便、产量大, 相比于传统抗体 IgG, 表现出更好的稳定性, 能够适应复杂的环境和食品基质, 作为 ELISA 中一种潜在的免疫元件, 弥补传统抗体在 ELISA 检测中的不足, 并进一步拓展单域抗体及其融合蛋白与 ELISA 的应用范围; 同时, 建立的 ENR ic-ELISA 可应用于水产品中 ENR 残留的检测, 为其他小分子物质免疫检测的研究提供了理论支持。

参考文献

- [1] XIAO X, HU S, LAI X, *et al.* Developmental trend of immunoassays for monitoring hazards in food samples: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2021, 111: 68–88.
- [2] WANG Z, ZHENG P, WANG J, *et al.* Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a broad-spectrum monoclonal antibody for tropane alkaloids detection in pig urine, pork and cereal flours [J]. Food Chem, 2021, 337: 127617.
- [3] JIN Y, JIN Z, SUN D, *et al.* Preparation of spirodiclofen monoclonal antibody and establishment of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Chem, 2023, 417: 135936.
- [4] WANG Z, YIN J, SU C, *et al.* Development of an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for virus detection based on porcine epidemic diarrhea virus monoclonal antibodies [J]. Viral Immunol, 2015, 28(3): 184–189.
- [5] 金萍, 丁洪流, 金晓红, 等. 纳米抗体在食品小分子污染物检测中的应用[J]. 食品与机械, 2023, 39(2): 236–240.
JIN P, DING HL, JIN XH, *et al.* Progress in the application of nano-antibody in the detection of small molecular contaminants in foods [J]. Food Mach, 2023, 39(2): 236–240.
- [6] WOLPER S, BATTLE S, LEE P, *et al.* Thermostable single domain antibody-maltose binding protein fusion for *Bacillus anthracis* spore protein BclA detection [J]. Anal Biochem, 2014, 447: 64–73.
- [7] 刘星, 陈奇. 鲨鱼源单域抗体的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1069–1082.
LIU X, CHEN Q. Progress in shark single-domain antibody [J]. Chin J Biotechnol, 2020, 36(6): 1069–1082.
- [8] LIU C, LIN H, CAO L, *et al.* Characterization, specific recognition, and the performance in fish matrix of a shark-derived single-domain antibody against enrofloxacin [J]. Talanta, 2023, 265: 124852.
- [9] DUMOULIN M, CONRATH K, MEIRHAEGHE A, *et al.* Single-domain antibody fragments with high conformational stability [J]. Protein Sci, 2002, 11(3): 500–515.
- [10] 刘明刚, 杨慧娟, 白宇琛, 等. 单域抗体在有害小分子检测领域的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7804–7812.
LIU MG, YANG HJ, BAI YC, *et al.* Research progress of single domain antibody in toxic small molecules detection field [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(19): 7804–7812.
- [11] WANG K, VASYLIEVA N, WAN D, *et al.* Quantitative detection of fipronil and fipronil-sulfone in sera of black-tailed prairie dogs and rats after oral exposure to fipronil by camel single-domain antibody-based immunoassays [J]. Anal Chem, 2019, 91(2): 1532–1540.
- [12] LIU Z, WANG K, WU S, *et al.* Development of an immunoassay for the detection of carbaryl in cereals based on a camelid variable heavy-chain antibody domain [J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(9): 4383–4390.
- [13] LIU X, XU Y, WAN DB, *et al.* Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin A in cereal [J]. Anal Chem, 2015, 87(2): 1387–1394.
- [14] GAYLORD ST, DINH TL, GOLDMAN ER, *et al.* Ultrasensitive detection of ricin toxin in multiple sample matrices using single-domain antibodies [J]. Anal Chem, 2015, 87(13): 6570–6577.
- [15] CHOI JH, LEE SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(5): 625–635.
- [16] LIU JL, ZABETAKIS D, BROWN JC, *et al.* Thermal stability and refolding capability of shark derived single domain antibodies [J]. Mol Immunol, 2014, 59(2): 194–199.
- [17] WESOŁOWSKI J, ALZOGARAY V, REYELT J, *et al.* Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity [J]. Med Microbiol Immunol, 2009, 198(3): 157–174.
- [18] OLICHON A, SURREY T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36314–36320.
- [19] BERNIER SC, CANTIN L, SALESSE C. Systematic analysis of the expression, solubility and purification of a passenger protein in fusion with different tags [J]. Protein Exp Purif, 2018, 152: 92–106.
- [20] BUTT TR, EDAVETTAL SC, HALL JP, *et al.* Sumo fusion technology for difficult-to-express proteins [J]. Protein Expression Purif, 2005, 43(1): 1–9.
- [21] DJENDER S, SCHNEIDER A, BEUGNET A, *et al.* Bacterial cytoplasm as an effective cell compartment for producing functional VHH-based affinity reagents and *Camelidae* IgG-like recombinant antibodies [J]. Microb Cell Fact, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0140-1>
- [22] WANG X, WANG Y, WANG Y, *et al.* Nanobody-alkaline phosphatase fusion-mediated phosphate-triggered fluorescence immunoassay for

- ochratoxin a detection [J]. *Spectrochim Acta A*, 2020, 226: 117617.
- [23] CHENG J, LIANG L, LIU Y, *et al.* Expression, purification of codon-optimized ochratoxin A nanobody-GST fusion protein and its one-step immunoassay for detection of OTA in cereal [J]. *J Food Compos Anal*, 2023, 123: 105530.
- [24] LIU Q, ZHOU J, WANG M, *et al.* Development of two new matrix certified reference materials for enrofloxacin and norfloxacin residues in fish meat powder [J]. *Measurement*, 2023, 218: 113216.
- [25] 席峰, 颜立立, 潘春霖, 等. 鱼类恩诺沙星药残消除研究进展[J]. *水产学报*, 2023, 47(10): 227-247.
XI F, YAN LL, PAN CL, *et al.* Research progress on elimination of enrofloxacin residues in fish [J]. *J Fish China*, 2023, 47(10): 227-247.
- [26] YANG F, ZHANG CS, DUAN MH, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin following single oral administration in yellow river carp (*Cyprinus carpio haematoperus*) [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 822032.
- [27] ZHANG Z, LIN H, SUI J, *et al.* The effect of chlorophyll on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of procymidone in vegetables and the way to overcome the matrix interference [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 102(8): 3393-3399.
- [28] 刘鑫, 屈跃宽, 曹立民, 等. 鲨鱼单域抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的表达及热稳定性分析[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(21): 110-115.
LIU X, QU YK, CAO LM, *et al.* Expression and thermal stability analysis of shark single domain antibody-alkaline phosphatase fusion protein [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(21): 110-115.
- [29] GOLDMAN ER, BROZOG-LEE PA, ZABETAKIS D, *et al.* Negative tail fusions can improve ruggedness of single domain antibodies [J]. *Protein Expression Purif*, 2014, 95: 226-232.
- [30] QU Y, HAN X, LIU X, *et al.* Preparation, characterization, and potential application of shark derived single domain antibody against myofibrillar binding serine protease in silver carp [J]. *J Food Process Preserv*, 2022, 46(10): 127617.
- [31] XU ZL, DENG H, DENG XF, *et al.* Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2012, 131(4): 1569-1576.
- [32] WANG X, LIN H, SUI J, *et al.* The effect of fish matrix on the enzyme-linked immunosorbent assay of antibiotics [J]. *J Sci Food Agric*, 2013, 93(7): 1603-1609.
- [33] WANG X, LIN H, CAO L, *et al.* Isolation, characterization, and identification of proteins interfering with enzyme-linked immunosorbent assay of antibiotics in fish matrix [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2016, 25(5): 1265-1273.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



贾成雨, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品安全与质量。

E-mail: jiachengyu9999@163.com



隋建新, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品安全与质量控制。

E-mail: suijianxin@ouc.edu.cn