

## 摘要

真菌毒素是由不同真菌种类产生的次生代谢物，主要是曲霉、赤霉、镰刀菌和青霉。据联合国粮食及农业组织(FAO)报道，世界上 25%的食物受到真菌毒素污染。然而，最近的一项研究表明，全世界 60~80%的作物受到真菌毒素的感染，这一数字超过了粮农组织给出的数字。曲霉属包括 4 个亚属 339 种。曲霉产生的真菌毒素被称为黄曲霉毒素。黄曲霉毒素是由各种类型的曲霉，特别是黄曲霉和寄生曲霉产生的次生代谢物，具有较强致癌作用。目前已经分离鉴定出来的黄曲霉毒素及其衍生物有 20 多种，其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)的毒性作用最强，被世界卫生组织的国际癌症研究机构(ARC)划分为 I 类致癌物质。为了避免 AFB<sub>1</sub> 的污染风险，几乎世界上所有的国家和地区都制定了 AFB<sub>1</sub> 的强制限量标准。

为了避免受到黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的污染，检测所有食物中 AFB<sub>1</sub> 的含量显得特别重要。当前有很多检测技术可应用于检测 AFB<sub>1</sub>，主要包括理化分析方法和免疫学方法等。其中，免疫学方法由于其精确度高，特异性强，操作简便等优点被广泛地用来检测 AFB<sub>1</sub>，但它需要高灵敏度和特异性的抗体。随着分子生命工程的持续发展，重组抗体特别是单链抗体 (Single chain Fv antibody fragment, ScFv) 由于其易于改造、批次间差异小、制备时间短和表达量高等优点成为研究板块。但是，单链抗体与其亲本单克隆抗体相比，亲和力较低此外稳定性较差，从而导致在应用上具有局限性。研究抗原抗体间的不同反应，阐明单链抗体亲和力的影响机制，可为在基因水平上改造单链抗体，进一步提高其亲和力提供理论指导。本研究通过全合成噬菌体展示库筛选制备黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的纳米抗体，进一步结合计算机辅助建模设计实现抗体优化，主要内容及实验结果如下：

(1)基于噬菌体展示技术利用实验室前期建成的全合成抗体库筛选制备黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 抗体基因 G5，在此基础上对其进行表达，以期获得大量与 AFB<sub>1</sub> 结合的单链抗体，随后通过创建表达载体，再将修饰表达载体转化至感受态细胞 BL21 (DE3)中，进行诱导后获得可翻译的蛋白即纳米抗体，用于生物活性的鉴定实验。ELISA 检测分析 G5 对 AFB<sub>1</sub>-BSA 的结合率以及 AFB<sub>1</sub> 对 G5 结合的抑制率，综合分析抗体亲和力。结果表明，G5 对 AFB<sub>1</sub>-BSA 的 EC<sub>50</sub> 约为 0.95 μmol/L AFB<sub>1</sub> 与抗体竞争结合 AFB<sub>1</sub>-BSA 的 IC<sub>50</sub> 约为 43 μmol/L，亲和力较好。

(2)考虑到 G5 可能存在亲和力不高、特异性不强的问题,提出了一种基于计算机引导的同源建模和分子对接的体外亲和力成熟方法来优化抗体,通过计算机辅助搜寻目标序列同源建模模板、再进行目标序列与同源模板的多重序列比对,同时对同源模型的构建和模型评估、优化,最终获得一个可靠的三维结构。从抗体-抗原复合结构上来看,根据该试验构建模型 G5 与 AFB1 的分子对接,进行相互作用力分析。对接结果按照复合物能量值排序,能量越低表明该结构越稳定。通过打分,最佳 G5-AFB1 复合物能量分值为-6.29 kcal/mol。G5-AFB1 复合物结构选择单链抗体的互补决定区(Complementarity Determining Regions,CDRs)区进行分析,AFB1 与纳米抗体结合的氨基酸残基位点为:TYR103、VAL102、ARG101、ILE51、THR52、THR58,并且 AFB1 与残基 ARG101 形成较稳定的氢键网络体系。其中氢键键长越短,作用力越强;同时还与残基 TYR103、VAL102、ILE51、THR52、THR58 形成了疏水作用。再通过 PyMol 可视化分析复合物 5A 内的氨基酸残基,选择最合适的残基 ARG101 进行突变,突变为 IEL101,利用重叠延伸(genesplicingbyoverlapextension PCR, SOE PCR)获得突变基因及其对应的蛋白 G5-1,经目的蛋白经纯化后,EC50 值为 0.196  $\mu\text{mol/L}$ ,亲和力提高了 9 倍;IC50 值为 10.27  $\mu\text{mol/L}$ ,抑制率提高了 4 倍,证明优化目的达到。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B1 噬菌体展示技术 全合成纳米抗体库 优化 分子对接

## Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites produced by various fungal species, predominantly *Aspergillus*, *Gibberellus*, *Fusarium* and *Penicillium*. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 25% of the world's food is contaminated with mycotoxins. However, recent studies suggest that mycotoxin contamination affects 60-80% of global crops - a figure exceeding FAO estimates. *Aspergillus* comprises four subgenera and 339 species; its mycotoxins are known as aflatoxins. Aflatoxins are secondary metabolites produced by several types of *Aspergillus* fungi, particularly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* which have potent carcinogenic effects. Over twenty different types of aflatoxin and derivatives have been identified thus far; among them, aflatoxin B1 (AFB1) has the strongest toxic effect and is classified as a Class I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) under World Health Organization guidelines. To mitigate risks associated with AFB1 pollution, most countries worldwide have established mandatory limits.

In order to prevent contamination with aflatoxin B1, it is crucial to conduct AFB1 level testing on all food products. Currently, there are various detection techniques available for detecting AFB1, including physicochemical analysis methods and immunological methods. Among these options, the immunological method is widely employed due to its high accuracy, strong specificity, and ease of use. However, it requires antibodies with high sensitivity and specificity. With the continuous advancement of molecular life engineering, recombinant antibodies have emerged as a research focus due to their advantages such as easy modification, minimal batch-to-batch variations, short preparation time, and high expression levels. Single chain Fv antibody fragments (ScFv) in particular have gained attention. Nevertheless, compared to their parent monoclonal antibodies, single-chain antibodies exhibit lower affinity and stability issues that limit their application potential. By studying the different interactions between antigens and antibodies and elucidating the mechanisms influencing single chain antibody affinity at the gene level can provide theoretical guidance for modifying single chain antibodies and enhancing their affinity further. In this study, nano-antibodies targeting aflatoxins B1 were prepared by screening a fully synthetic phage display library while incorporating

computer-aided modeling design for antibody optimization purposes. The main contents and experimental results are outlined as follows:

(1) Utilizing phage display technology, the aflatoxin B1 antibody gene G5 was screened and prepared using a fully synthetic antibody library constructed in the early stages of this study. Subsequently, it was expressed to generate a substantial quantity of single-chain antibodies specifically binding to AFB1. An expression vector was then created and transformed into receptive cell BL21(DE3). Following induction, translatable proteins known as nano-antibodies were obtained for biological activity identification. The binding rate between G5 and AFB1-BSA as well as the inhibitory effect of AFB1 on G5 were analyzed through ELISA, comprehensively evaluating the antibody affinity. The results demonstrated that G5 exhibited an EC50 value of approximately 0.95  $\mu$  mol/LAFB1 towards AFB1-BSA, with an IC50 value around 43  $\mu$  mol/LAFB1-BSA, indicating favorable affinity.

(2) Considering that G5 may not have high affinity and strong specificity, an in vitro affinity maturation method based on computer-guided homology modeling and molecular docking was proposed to optimize the antibody. The target sequence homology modeling template was searched with computer assistance, and multiple sequence alignment between the target sequence and the homology template was performed. At the same time, the homologous model is constructed, evaluated and optimized, and finally a reliable three-dimensional structure is obtained. From the perspective of antibody-antigen complex structure, the molecular docking of model G5 and AFB1 was constructed according to the experiment, and the interaction force analysis was carried out. The docking results are sorted according to the energy value of the complex, and the lower the energy, the more stable the structure is. The optimal energy fraction of G5-AFB1 complex is -6.29 kcal/mol. The structure of G5-AFB1 complex was selected for analysis in the Complementarity Determining Regions (CDRs) region of single-chain antibody. The amino acid residues binding AFB1 to the nanoantibody are as follows: TYR103, VAL102, ARG101, ILE51, THR52, THR58, and AFB1 formed a stable hydrogen bond network with residue ARG101. The shorter the hydrogen bond length is, the stronger the force is. It also has hydrophobic interaction with residues TYR103, VAL102, ILE51, THR52 and THR58. Through PyMol visualization analysis of compound amino acid residues within the 5 a, select the most appropriate residues ARG101 mutation, mutated into IEL101, by overlap extension (genesplicingbyoverlapextension PCR, The mutant gene and its corresponding protein G5-1 were obtained by SOE PCR. After purification of the target protein, the EC50 value

was 0.196  $\mu$  mol/L, and the affinity was increased by 9 times. The IC<sub>50</sub> value is 10.27  $\mu$  mol/L, and the inhibition rate is increased by 4 times, which proves that the optimization goal has been achieved.

**Keywords:** Aflatoxins B1 Phage Display Technology Fully Synthetic Nanoantibody Library Molecular Docking

## 缩略词表

英文全称	缩略词	中文名称
Variable domain of heavy chain	VH	重链可变区
Variable domain of light chain	VL	轻链可变区
Single chain fragment variable	ScFv	单链抗体
Single domain antibody	sdAb	单域抗体
fragment of antigen binding	Fab	抗原结合片段
Complementarity determining region	CDR	互补决定区
Fragment region	FR	框架区
heavy chain antibody	HcAb	重链抗体
Variable domain of heavy chain antibody	VHH	重链抗体可变区
Colony-forming of infection	cfu	菌落形成单位
Glycine-Hydrochloride	Gly-HCl	甘氨酸-盐酸
Optical density	LOD	吸光度
Horseperoxidase	HRP	辣根过氧化物酶
Kilodalton	kDa	千道尔顿
Polyacry lamide gel electrophoresis	PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
Tetramethyl benzidine	TMB	四甲基联苯胺
Ampicillin	Amp	氨苄青霉素
Kanamycin	Kana	卡那霉素

## 目 录

<b>1 绪论</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 黄曲霉毒素</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 发现及分布.....	1
1.1.2 种类及毒性.....	1
1.1.3 限量标准.....	2
1.1.4 常用检测方法.....	3
1.1.4.1 AFB1 的理化分析法.....	3
1.1.4.2 AFB1 的免疫学分析法.....	5
<b>1.2 纳米抗体技术的研究进展</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 基因工程抗体.....	6
1.2.2 纳米抗体.....	7
1.2.3 噬菌体展示技术.....	7
1.2.3.1 噬菌体抗体展示库分类.....	8
<b>1.3 同源建模与分子对接</b> .....	<b>9</b>
1.3.1 定点突变技术概括.....	10
<b>1.4 本研究目的意义和内容</b> .....	<b>10</b>
1.4.1 研究目的和意义.....	10
1.4.2 研究内容.....	11
1.4.3 技术路线图.....	11
<b>2 基于全合成纳米抗体库的黄曲霉毒素 B1 抗体制备</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 实验材料和仪器</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 试验材料.....	13
2.1.2 仪器与设备.....	13
2.1.3 试剂配制.....	14
<b>2.2 实验方法</b> .....	<b>14</b>
2.2.1 AFB1 毒素完全抗原制备与鉴定.....	14
2.2.2 AFB1 特异性噬菌体的筛选.....	14
2.2.3 噬菌体-酶联免疫吸附试验鉴定噬菌体上清特异性.....	15
2.2.4 高亲和力噬菌体单克隆挑选.....	16
2.2.5 ScFv 的表达载体构建.....	16
2.2.5.1 PCR 扩增筛选抗体序列.....	16
2.2.5.2 琼脂糖 DNA 凝胶电泳分离抗体基因及胶回收.....	16
2.2.5.3 重组质粒的构建及转化.....	16
2.2.6 蛋白表达条件优化.....	18
2.2.6.1 诱导表达时间的选择.....	18
2.2.6.2 最适培养温度.....	18

2.2.6.3 IPTG 浓度的选择 .....	18
2.2.6.4 蛋白超声时间的确定 .....	18
2.2.7 优化后融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化及分析 .....	19
2.2.8 Bradford 法测定蛋白浓度 .....	19
2.2.9 纳米抗体结合率分析 .....	19
2.2.10 纳米抗体抑制率分析 .....	19
2.2.11 纳米抗体交叉率分析 .....	19
<b>2.3 统计学处理 .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 结果与分析 .....</b>	<b>20</b>
2.4.1 AFB1 完全抗原合成 .....	20
2.4.2 抗体库的富集筛选 .....	20
2.4.3 噬菌体上清特异性鉴定 .....	21
2.4.4 阳性单克隆噬菌体的序列分析 .....	22
2.4.5 纯化条件的确定 .....	22
2.4.5.1 诱导时间对融合蛋白的影响 .....	22
2.4.5.2 诱导温度对融合蛋白的影响 .....	23
2.4.5.3 诱导剂浓度对融合蛋白的影响 .....	24
2.4.5.4 超声波破碎处理时间对融合蛋白的影响 .....	25
2.4.6 抗体的表达和纯化 .....	25
2.4.7 纳米抗体蛋白浓度测定 .....	26
2.4.8 纳米抗体结合率与抑制率分析 .....	27
2.4.9 纳米抗体交叉率分析 .....	27
<b>2.5 讨论 .....</b>	<b>28</b>
<b>3 AFB1 纳米抗体的计算机优化 .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 材料 .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 实验材料 .....	29
3.1.2 生物信息软件和数据库 .....	29
<b>3.2 方法 .....</b>	<b>30</b>
3.2.1 抗 AFB1 单链抗体 G5 的同源建模 .....	30
3.2.1.1 目标序列同源建模模板的确定及序列比对 .....	30
3.2.1.2 同源模型的构建 .....	30
3.2.1.3 同源模型结构可靠性的评估与分析 .....	30
3.2.2 抗 AFB1 单链抗体 G5 三维模型的分子对接 .....	30
3.2.2.1 受体蛋白的准备 .....	30
3.2.2.2 配体小分子的准备 .....	31
3.2.2.3 分子对接 .....	31
3.2.2.4 关键氨基酸位点分析 .....	31
3.2.2.5 针对残基进行优化 .....	31

<b>3.3 结果与分析</b> .....	<b>32</b>
3.3.1 计算机辅助同源建模.....	32
3.3.1.1 同源建模结果分析.....	32
3.3.2 分子对接模拟分析.....	34
3.3.3 关键氨基酸残基位点分析.....	35
3.3.4 关键氨基酸残基位点优化.....	36
3.3.5 突变后的亲和力和识别位点验证.....	36
<b>3.4 讨论</b> .....	<b>37</b>
<b>4 结论与展望</b> .....	<b>39</b>
4.1 结论.....	39
4.2 创新点.....	40
4.2 展望.....	40
<b>参考文献</b> .....	<b>41</b>
<b>攻读学位期间发表论文与研究成果清单</b> .....	<b>47</b>
<b>致谢</b> .....	<b>48</b>

# 1 绪论

## 1.1 黄曲霉毒素

真菌毒素是由不同真菌种类产生的次生代谢物，主要是曲霉、赤霉、镰刀菌和青霉。据联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations,FAO)报道，全世界有 25%的食品受到真菌毒素污染<sup>[1]</sup>。然而，最近的一项研究表明，全世界 60~80%的作物受到真菌毒素的感染<sup>[2]</sup>，这一数字超过了粮农组织给出的数字。曲霉属包括 4 个亚属 339 种<sup>[3]</sup>。曲霉产生的真菌毒素被称为黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)。AFs 是由不同类型的曲霉，特别是黄曲霉和寄生曲霉产生的次生代谢物，具有致癌性和毒性。目前已经分离鉴定出来的 AFs 及其衍生物有 20 多种，其中黄曲霉毒素 B1 (AflatoxinB1, AFB1)的毒性作用最强<sup>[4]</sup>，对 AFB1 的第一次研究可以追溯到 20 世纪 50 年代末和 60 年代初。新的先进技术也使人类能够利用不同的方法研究 AFB1 的结构及其生物合成途径，从而可以在早期阶段检测到 AFB1。

### 1.1.1 发现及分布

在 1960 年代，大约有 100,000 只火鸡在英格兰东南部的一个农场突然死亡，该病的病因不明，被称为“土耳其病 X”，之后是两万只鸭子也被涉及<sup>[5]</sup>。进一步的研究已经确定，这一案例的来由是这些火鸡和鸭子食用的饲料花生粉被 AFB1 所污染<sup>[6]</sup>。在美国麻省理工学院的 Bichi 教授的研究小组确定了黄曲霉毒素的化学成分后，研究人员对黄曲霉毒素进行了广泛而详细的研究。

AFB1 已在农产品和食品中被发现，发霉的玉米、小麦、大豆、燕麦、大米，霉变的花生、坚果、棉籽、植物油以及肉制品也可能含有 AFs，特别是在热带和亚热带气候中，高温和潮湿使检出率更高。近几十年来，AFB1 的检出率逐渐提高，越来越多的原料和产品被发现污染 AFB1。2011 年，中华人民共和国质量监督检验检疫总局报告称，蒙牛企业产品液态奶中的 AFs 严重超出国标限定范围<sup>[7]</sup>。2016 年 3 月，台湾食品药品监督管理局在花生糖中检测到黄曲霉毒素超标。这些原料和产品往往受到 AFs 的污染，不仅严重影响中国农产品出口，而且对人体健康构成威胁<sup>[8]</sup>。

### 1.1.2 种类及毒性

目前对于已经鉴定出来 AFs 及其衍生物<sup>[9]</sup>,研究的热点包括黄曲霉毒素 B1(AFB1)、黄曲霉毒素 B2(AFB2)、黄曲霉毒素 G1(AFG1)、黄曲霉毒素 G2(AFG2)、黄曲霉毒素 M1(AFG2)、黄曲霉毒素 M1(AFG2、AFG2)和黄曲霉毒素 M(AFG2)。其中, AFM1 和 AFM2 分别来自 AFB1 和 AFB2, 由人类或哺乳动物在不正确注射含 AFs 的食物后代谢转化而来, 再由动物通过尿液、汗腺等代谢途径将其排泄出体外<sup>[10]</sup>。

真菌毒素中, AFs 是目前为止发现的最为稳定的真菌毒素之一, 无色无气味, 其结构式为 C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 末端带有双键的双呋喃环结构, 还有一个氧杂萘邻酮环<sup>[11,12]</sup>, 这是与癌症有关的毒理学结构和腐蚀剂<sup>[13]</sup>。其不溶于水、石油, 溶于甲醇、乙醇等有机溶剂, 分子量范围为 312~346。由于含黄曲霉毒素的大环共轭系统, 因此具有较高的热稳定性, 分解温度为 237~299℃, AFB1 分解温度为 268℃。AF 可以在 365 nm 的紫外线下发出荧光, 荧光蓝色的 AFB1 和 AFB2, 以及荧光黄绿色的 AFG1 和 AFG2。紫外线也会对黄曲霉毒素的低浓度产生毁灭性的影响<sup>[14]</sup>, 在黄曲霉毒素几种代谢物中, AFB1 毒性最强, 其次是 AFM1, AFG1 排第三<sup>[15]</sup>。

AFs 在植物的生长、收获、运输、储存和加工过程中会受到污染。食物链中的动物性食物相互作用, 导致肉类、蛋类和牛奶等动物产品受到污染, 最终对人类健康造成污染<sup>[16]</sup>。黄曲霉毒素对牛和家禽的毒性与食物摄入量、持续时间、持续时间、动物、性别、年龄、健康状况、发育阶段和营养管理质量有关。根据研究统计, 来自不同类型黄曲霉毒素沉积物中的环类毒素的毒性达到氰化钾毒性的 10 倍、砷的 8 倍; AFB1 在不同的组织和器官中中毒, 主要破坏 DNA 和核糖酸中的蛋白质、酶和有机物质, 破坏各种代谢过程, 最终造成全身损伤。继续使用 AFB1 和受污染的饮食会导致具有临床影响的各种威胁, 如血液和代谢变化: 家禽疾病, 饮食失调的振荡, 消化和消化系统疾病, 多有机出血, 生育能力下降, 发育障碍, 发育障碍和癌症等<sup>[17]</sup>。

### 1.1.3 限量标准

在公共卫生领域, AFs 的潜在致癌性受到全球关注。1993 年, AFB1 被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为 I 类致癌物质<sup>[18]</sup>。这一分类彰显了对人类健康的威胁不容忽视, 特别是其在食品及其原材料中广泛的污染足迹。正因为 AFs 对人们的健康具有极大的危害且污染食品及其原料范围较为广泛, 为了防范可能出现的风险, 保障人们的健康, 世界卫生组织(WHO)/联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization, FAO)于 1966 年首次制定黄曲霉毒素的含量上限, 目前几乎所有的国家政府及地区都针对黄曲霉毒素根据自身的风险评估

制定了不同的监管标准<sup>[19]</sup>，以降低对健康的风险并保障食品安全。我国制定的食品中黄曲霉毒素的控制水平规定为 0.5~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[20]</sup>，如表 1。欧盟国家和地区则对食品中黄曲霉毒素含量实行更加严格的监管制度，普通食品中的最大允许含量定为不超过 0~8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，而对于婴幼儿特殊食品的要求则界定在极其苛刻的不得超过 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[21-23]</sup>。值得注意的是，我国在制订相关标准时，仅对 AFB1 和 AFM1 两种特定类型的黄曲霉毒素进行了限定，并未对总量设限，与国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)、欧盟(European Union, EU)以及美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的规定相比，我们的标准明显偏高。这不仅影响到了我国农产品在国际贸易中的竞争力，也因此承受了不小的经济损失，而这正是需要我们关注并积极改进的地方。

表 1.1 黄曲霉毒素 B1 和黄曲霉毒素 M1 的限量指标

Table 1.1 Limit indexes of aflatoxin B1 and aflatoxin M1

食品	毒素类型	限量(MLs)/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
玉米,花生及其制品	AFB1	20
大米、植物油(除玉米油、花生油)	AFB1	10
其他粮食、豆类、发酵食品	AFB1	5
婴幼儿配方食品	AFB1	5
鲜乳	AFM1	0.5
乳制品(折算为鲜乳汁)	AFM1	0.5

#### 1.1.4 常用检测方法

如今，全球范围内对 AFs 制定了明确的阈值标准。这些标准不仅体现了对食品安全严格把控的国际共识，也必然对检测技术提出了更高要求——精确度与敏感性双重考验。关于 AFs 的检测技术，大致可归入两大类：一是生理学法，二是免疫学法。两者各有侧重，旨在全方位保障食品的安全性和稳定性。

##### 1.1.4.1 AFB1 的理化分析法

黄曲霉毒素的物理检测主要基于碎裂特性、光谱等物理化学性质以及其他先进的检测方法。其中包括薄层析、气相色谱分析、高效液相色谱、高效液相技术和质谱仪。由于 AFB1 不具有挥发性，需要气相色谱法进行分析<sup>[24]</sup>，因此关于色谱气分析方法的文献并不多。

##### (1) 薄层色谱法

薄层色谱法(TLC)薄层色谱法是一种适用于复杂混合样品的吸附薄层色谱分离方法<sup>[25,26]</sup>。自 20 世纪 50 年代发展以来，薄层色谱法已广泛应用于生物学、医

学和化学工业等领域。近年来,它已被用于食品分析和质量控制,并已成为实验室的常规技术。许多报告表明,薄层色谱可以应用于食品工业的各个阶段,如以食品原料、配料和添加剂为代表的传统物质阶段,以及以有害物质和污染物为代表的非常规物质阶段。化合物的检测和测定几乎涵盖了所有的物质类别<sup>[27-30]</sup>。薄层色谱法利用各组分对同一吸附剂的不同吸附能力,使流动相(溶剂)流经固定相(吸附剂)时,发生连续的吸附、解吸、再吸附、再解吸,实现各组分的相互分离<sup>[31]</sup>。虽然 TLC 方法已经成熟,但仍存在检测精度低、实验过程中挥发性对实验操作人员和环境有害、样品前处理复杂等缺点<sup>[32,33]</sup>。

近年来, TLC 与图像分析相结合以及与表面增强拉曼光谱、质谱、核磁共振等新技术相结合等跨学科方法进一步促进了薄层色谱的发展,增强了薄层色谱在食品分析中的实用性<sup>[34-37]</sup>。TLC 用于检测各种食品中的有害物质,如食用油中的 AF,是食品科学方法中有效的分析工具<sup>[38]</sup>。

## (2) 高效液相色谱法

高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)是很多研究室用于毒素检测的最广泛应用的体外方法<sup>[39,40]</sup>,包括输出、清洗和测试三个阶段<sup>[41]</sup>。其原理是原理是以其精细的分子分配原理,促使流动相与固定相间,待检化合物显现出差异性的相互作用力。因此,这些差异导致化合物在移动过程中被有序分离。特别是对 AFB1 来说,在通过色谱柱后,其经由电化学方法衍生化,能激发出具有特异性的荧光信号。借此,荧光检测器便可对其进行定性及定量分析<sup>[42]</sup>。然而,AFs 的荧光活性通常较弱,特别是在复杂样本的多组分分析中,要面临荧光信号被猝灭的难题,这不仅削弱了荧光性质,也降低了分析测量的灵敏度与准确度<sup>[43][44]</sup>。为解决此一问题,实验中通常将黄曲霉毒素进行特定的衍生化处理,从而显著提升其荧光强度,增强了检测手段的灵敏性。Takahashi 等人提出了一种基于柱前衍生化的研究,通过引进三氟乙酸衍生化策略,有效地瓦解了 AFB1 和 AFG1 分子结构上的双键,获得了高荧光活性的代谢产物 AFB2a 和 AFG2a。此衍生物不仅明显增强了样品的荧光特性,同时将检测下限提至 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,显著提升了测定的灵敏度<sup>[45]</sup>。然而,柱前衍生的 AFB2a、AFG2a 理化性质并不稳定,为此,又研究了柱后衍生的新方法,包括柱后溴衍生化法、柱后碘衍生化法等<sup>[46-48]</sup>。HPLC 具有测量准确、精度高、灵敏度高、在大样品分析中应用多样、自动化程度高等优点,可节省大量人力和物力<sup>[49,50]</sup>。但也有缺点,如纯度要求高、医疗复杂、设备昂贵、需要更专业的技术人员等<sup>[51,52]</sup>。

## (3) 基于理化性质的其他方法

除了以上方法外,高效液相色谱-质谱(High performance liquid chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS)联用技术通过样本中两个成分之间的有机结

合,能分别进行定量和定性分析,具有较强的分离能力、独特的选择性、高灵敏性,在食品安全领域<sup>[53]</sup>、环境测试<sup>[54]</sup>和药物分析面得到广泛使用,并用于真菌毒素检查和检测<sup>[55]</sup>;荧光光度法具有分离能力强、重方现性好等优点<sup>[56]</sup>,只是检测总量、操作繁琐;高效毛细管电泳测定法是借助样品组分在电场驱动下的迁移速度差异及其在介质中的分布特性,实现有效分离的现代色谱方法。

#### 1.1.4.2 AFB1 的免疫学分析法

近年来,除了传统的色谱技术外,研究人员还经常使用免疫化学方法来测定食品中的真菌毒素。免疫化学的核心是免疫球蛋白(Igs)与抗原(Ags)的特异性相互作用。几种免疫化学方法已被应用于食品中真菌毒素的检测,如免疫亲和柱法、酶联免疫吸附法、放射免疫测定法和电化学免疫传感器法等<sup>[57]</sup>。

##### (1) 免疫亲和柱法

免疫亲和色谱技术(Immune affinity chromatography, IAC)挟带了一种精密的分子识别机制,通过将抗黄曲霉毒素抗体与凝胶载体相结合,并填充于专门设计的色谱柱内。此时,待检样品在通过该柱时,其中携带的黄曲霉毒素便能与抗体发生特异性作用,紧密结合并被截留,而非靶向组分则顺利洗脱。这项技术对于剔除干扰基质带来的噪声、增强测量灵敏度和准确率方面有着不可小觑的优势。将免疫亲和色谱法作为样本前处理步骤,进而与其他检测策略联用,已成为黄曲霉毒素检测的标准流程之一。马良等学者对此技术的应用进行了深入探索,提出了一个创新的免疫亲和柱与荧光检测相结合的方法,用以评估花生及其衍生物中 AFB1 的含量。所报告的方法不仅具有 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的低最限量水平,同时在检测时间以及成本上也显示出较传统仪器检测手段更为显著的优势<sup>[58]</sup>。

##### (2) 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附试验(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)是检测真菌毒素最常用的方法之一<sup>[59]</sup>。它是根据 Igs 和 Ags 之间特异性免疫反应的原理设计和开发的。这种免疫测定的特异性是由于使用酶标记的 Igs 或 Ags 和固体基质限制性免疫球蛋白来捕获分析物中未标记的银,并用标记的免疫球蛋白进行检测。ELISA 虽然在食品分析、临床实践、生物技术、环境、化工等行业得到了很好的发展和广泛的应用,但仍存在一些不足,如靶抗原与基质组分相互作用导致对基质的过度依赖。标准 ELISA 由免疫识别元件、吸附底物、酶标、显色试剂四个主要部分组成,中心部分的缺失是导致 ELISA 局限性的根本原因。近年来,研究人员采用多种技术交叉融合的方法来驱动某一组分或整个 ELISA 的性能,特别是在灵敏度、准确性和稳定性方面<sup>[60]</sup>。

对于霉菌毒素，由于 ELISA 的高单一性，开发的试剂盒具有特异性识别能力，已广泛应用于霉菌毒素的检测<sup>[61]</sup>。如 Qi 等<sup>[62]</sup>采用 ELISA 和 UPLC-MS/MS 检测花生油中的 AFB<sub>1</sub>，虽然 LOD 仅为 1.08  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ，但远高于 UPLC-MS/MS 的 LOD(LOD 为 0.01  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )。它因其准确、快速和其他优点而得到肯定。对于实际检测不同食用油(豆油、椰子油、花生油、茴香油、甜瓜油、棕榈仁油)中其他有害物质 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 等，ELISA 检测结果令人满意，且浓度低于法定限值<sup>[63-65]</sup>。在此基础上，研究人员开发了一种可检测 AFB<sub>1</sub> 的商用 ELISA 试剂盒，该试剂盒可应用于包括食用油在内的多种样品，检测限可低至 3 ppb。虽然目前的 ELISA 技术或试剂盒还存在耗时、成本高、操作繁琐等问题，但随着技术的进步，ELISA 技术显示出强大的应用潜力<sup>[66]</sup>。

### (3) 放射免疫测定法

放射性免疫测定技术(Radioimmunoassay, RIA)，采用核素标记的方法对抗原-抗体反应进行定量，其灵敏性与准确度较高<sup>[67]</sup>。然而，与酶联免疫吸附测定(ELISA)相比，后者使用酶标记取代放射性同位素，因此在安全性及操作便利性上更受欢迎。尽管 RIA 在临床和基础研究中因其高度特异性与精准度而价值显著，但放射性标记的使用限制了其广泛应用，原因在于潜在的生物活性改变与对操作者健康构成的风险。因此，RIA 虽在某些领域能提供无可替代的分析优势，其应用仍需谨慎考量。

### (4) 电化学免疫传感器法

电化学生物传感(electrochemical immunoassay)装置由于快速、占地面积小、经济、敏感和独特的性能，在食品质量评估中受到了特别的关注，主要反映食品样品中 AFB<sub>1</sub> 的水平<sup>[68]</sup>。AFB<sub>1</sub> 电化学生物传感器可以产生各种类型的分析信号，如电压、电流和阻抗<sup>[69,70]</sup>。标准的转导方法有安培法、电化学阻抗谱法和伏安法。

### (5) 基于免疫学理论的其它方法

除了上述提到的免疫学检测方法，还有胶体金免疫层析分析法(Gold Immuno-chromatography Assay, GICA)是以胶体金作为示踪标记物的一种免疫标记技术<sup>[71]</sup>、还有荧光偏振免疫测定<sup>[72]</sup>、生物芯片分析技术<sup>[73]</sup>等都有一定的研究，这些方法具有较高的灵敏度和稳定性，但大部分需要配备专业技术人员和昂贵的设备，加上操作步骤繁琐，成本高等缺点而被限制了应用。

## 1.2 纳米抗体技术的研究进展

### 1.2.1 基因工程抗体

转基因抗体也被称为第三代抗体,是通过植物细胞和哺乳动物细胞的基因重组产生的,产生抗体的新元素被表达并折叠到相应的载体细胞中<sup>[74]</sup>。Morrison 等<sup>[75]</sup>构建开发基因抗原与人恒定区契合抗体分子为基因工程奠定了坚实的基础。因为分子小,无需对动物免疫<sup>[76]</sup>,基因抗体在食品安全测试中具有独特的优势。

### 1.2.2 纳米抗体

纳米抗体作为基因工程抗体的一种,一般来源于骆驼科动物(如单峰骆驼、羊驼等)抗体的重链可变区,是目前发现尺寸最小的天然抗原结合片段,具有特异性强、稳定性高、产量高、耐受有机溶剂等优点,在粮食污染的生物毒素检测应用中潜力巨大。其分子量仅为 15 kDa,是传统单克隆抗体分子量(150 kDa)的十分之一,小于同为基因工程抗体的单链抗体(single-chain fragment variable, scFv, 分子量为 27 kDa)和抗原结合片段(fragment antigen binding, Fab, 分子量约为 57 kDa)。1993 年,在骆驼血清中首次报道了一种天然的、小的、功能性的重链抗体(HCAbs)<sup>[77]</sup>。与具有异四聚体结构的传统抗体不同,骆驼源性 HCAb 缺乏轻链多肽,并且在重链中缺乏第一恒定结构域(CH1)。值得注意的是, HCAbs 中的抗原结合片段只包含一个单变量结构域。该结构域被称为 VHH,也被称为单域抗体(sdAb)或纳米体(Nb)<sup>[78]</sup>。独特的是,这些纳米体严格的单体状态提供了在体外克隆和表达后能够独立识别和结合抗原的能力<sup>[79]</sup>,例如简化的单体 VHH-Fc 抗体<sup>[80,81]</sup>和在酿酒酵母中小规模的分泌型 VHH 表达<sup>[82]</sup>。在抗体工程中具有广阔的应用前景,引起了众多生物学家的关注。例如,人源化 VHS,即使用重组基因技术制备的仅重链抗体的重组可变结构域<sup>[83]</sup>,已被用于癌症靶向治疗。显然,与传统单克隆抗体相比,纳米抗体靶向药物的出现可以极大地促进抗体药物在肿瘤治疗领域的发展。CAR-T 疗法带来了免疫肿瘤治疗的突破。

### 1.2.3 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术噬菌体是在细菌细胞内感染和复制的病毒。丝状噬菌体颗粒将单链 DNA 注入目标细菌细胞,用于随后在宿主细胞质内复制和组装新的病毒粒子。能够感染大肠杆菌的丝状噬菌体表现为从宿主细菌分泌的长而细的细丝,没有细胞裂解。由于易于操作和在一定温度和 pH 范围内的稳定性, F 菌特异性丝状噬菌体物种,包括 F1、Fd 和 M13,可作为组合技术的可靠载体,第一批在噬菌体表面显示的人类抗体文库于 20 世纪 90 年代初发表。抗体噬菌体展示技术的基础是将大量人类抗体基因亚克隆到大肠杆菌表达载体中,并将其包装成丝状噬菌体<sup>[84]</sup>。从宿主细菌细胞生产后,这些噬菌体颗粒在其表面显示抗体片段,作为与病毒外壳蛋白之一的融合产物。必须对建立的文库进行筛选,以分离感兴趣的噬菌体抗体。为了确保文库中所有免疫球蛋白变体的代表性,通常筛选的噬菌

体颗粒数量要大于唯一抗体序列的总数。由于丝状噬菌体每毫升培养液可产生高达  $10^{13}$  个滴度，因此在选择实验中很容易实现这种倍数过剩。

抗体展示库选择的目的是分离出具有所需功能特性的抗体变体。筛选纯化的异质噬菌体文库成员，以鉴定和丰富感兴趣的抗体序列<sup>[85]</sup>。这种噬菌体文库选择通常包括捕获目标抗原，通过固定在塑料表面(固相)或偶联到磁珠(溶液相)。当与捕获的抗原孵育时，噬菌体表面溶液中纯化的病毒粒子允许结合特异性抗体变体。多次洗涤去除非结合噬菌体颗粒，而附着的噬菌体通常在低或高 pH 条件下被洗脱，以破坏抗体-抗原结合。在这个洗脱步骤之后，这些噬菌体抗体被用来感染大肠杆菌培养物，以扩增抗原反应文库亚群。从这个初始选择事件中纯化的、扩增的噬菌体抗体用于后续的筛选。由于非特异性结合的可能性，至少要进行两到三轮这种类型的迭代库选择，以丰富阳性结合并减少“背景”结合事件。

### 1.2.3.1 噬菌体抗体展示库分类

噬菌体抗体展示库通常可以分为三类<sup>[86-88]</sup>：

(1) 天然(naïve)抗体库，直接从未免疫的健康供体收集抗体分泌细胞，通过 PCR 的手段扩增抗体基因，然后克隆到噬菌体展示载体上，在其表面展示多样性的抗体蛋白库。天然库的优点是能够比较真实的反映健康供体的免疫系统抗体组成，都是经过体内免疫系统进化选择得到的表达和稳定性优势分子，抗体类型上没有特别的倾向性，只要库的容量足够大，理论上可以从中获得几乎所有类型靶点的抗体，经该抗体库筛选到完全是人的抗体，不需要额外进行抗体人源化即可用于治疗作用。

(2) 免疫(immunized)抗体库，用于收集抗体基因建库的供体是经过特定抗原免疫(或者感染，对于微生物而言)的，这类库的优势是可能容易得到针对该抗原亲和力特别高的抗体，但是免疫库必须针对每个抗原进行单独构建，而且一般无法获得人的免疫库，分离的动物来源的抗体基因必须经过复杂的人源化过程才能用药。

(3) 合成或者半合成(synthetic or semi-synthetic)抗体库，通过分析抗体数据库中大量抗体分子的氨基酸组成和抗体结构的规律，根据数据统计和模拟结果，人工合成多样的抗体基因建成的抗体库。根据是整个抗体分子或者分子的局部采用合成的方式，分为合成库和半合成库。这类抗体库的优点是可以通过合成的方式极大的增加抗体分子的多样性，很轻易的将抗体库的容量提升到  $10^{12}$  以上，可以根据抗原抗体相互作用的真实结构或者是结构模拟信息，有目的的设计特殊的局部多样性来筛选抗体或者改进某些抗体的特殊性质。

如今,噬菌体展示技术在抗体开发领域地位日益显著,大幅度降低了了开发成本与周期,噬菌体展示抗体库的在粮食污染常见生物毒素(如 AFT、DON、OTA 等) 抗体制备中的应用被广泛关注。Qiu 等人<sup>[89]</sup>利用天然噬菌体展示库筛选制备了 DON 的纳米抗体,灵敏度达到 1.16 ng/mL。目前,就此类生物毒素而言,通过噬菌体展示技术制备的抗体多来源于天然库或免疫库,因为二者具备更高的亲和力。但是,噬菌体合成库可能具备更大优势,它的多样性是三者最高的,理论上可以被无限提升,可以实现任何抗原的抗体开发,且有效避免了毒素免疫失败的过程,而其抗体受限的亲和力也可通过体外亲和力成熟进一步优化。

### 1.3 同源建模与分子对接

随着结构生物学、生物信息学以及计算生物学的进步,计算计算机同源建模和分子对接技术提高了一些大分子药物(通常是抗体药物)的设计成功率,近年来,人工智能(AI)技术已成为未来药物开发的热点话题,例如,构建庞大的虚拟抗体库并通过超级计算和分子模拟对接实现位置八点的短期(约 2-3 天)虚拟筛选,可能成为更高效、更合理的抗体药物研发平台<sup>[90,91]</sup>。Wang 等人在筛选获取针对新型冠状病毒 N 蛋白的抗体后通过计算机同源建模和分子模拟对接对抗体氨基酸优化进行了预测,实验证实优化后抗体亲和力提升了约两个数量级,与预测结果基本相符。在目前的分子工程领域,各类突变技术的应用已日益成熟,从而使得蛋白质及抗体的功能优化成为可能。其中,随机突变、链置换和定点突变等方法被广泛运用于增强抗体与抗原的结合亲和力。在随机突变策略中,易错聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction,PCR)是一种行之有效的手段。通过选用固有错误率较高的 DNA 聚合酶以及优化 PCR 条件,可以在扩增基因过程中引入随机性突变,进而筛选出具备优良特性的突变体。例如,Wang 等<sup>[92]</sup>研究人员利用此技术对 HC-1 抗体的重链和轻链基因进行了随机突变,并从酵母表达库中筛选出了亲和力提升 92 倍的突变体。

链置换则是结合抗体工程中的一个关键技术,它涉及到将抗体的一条链保持不变,而另一条链则通过置换来引入新的多样性。这种多样性是通过大规模随机组合实现的,从而极大地丰富了抗体库的多样性,增加了获得高亲和力抗体的概率。Brockmann 等学者便是使用这种技术构建了庞大的轻链置换库,最终筛选出了亲和力显著提高近 20 倍的抗溶菌酶抗体<sup>[93]</sup>。随着结构生物学领域的突飞猛进,大量抗原-抗体复合物结构的解析使得基于结构定点突变的方法日益精准。针对抗体的互补决定区(CDR)或构架区(FR)进行精细的突变,已经成为提升特定抗体亲和力的有力策略。邓龙等人的研究就是一个典型例证,他们对单链抗体的关键

氨基酸残基(氨基酸残基 HArg40 和 LHis38 突变为 HLeu40 和 LLeu38)进行了精确的定点突变,成功地提升了其对特定抗原的灵敏度及亲和力,亲和力比野生型单链抗体提高了 2.23 倍<sup>[94,95]</sup>。

综上所述,通过运用这些先进的突变方法,科研工作者能够在蛋白质工程领域达成突破性的进展,不仅推动了生物药物的发展,同时也为未来的疾病治疗提供了更为精准有效的方案。

### 1.3.1 定点突变技术概括

定点突变(Site-directed mutagenesis)核心是通过引入特定的 DNA 序列变化来改变基因组中的一个或多个碱基对,从而产生特定的基因变异<sup>[96]</sup>。其中最常用的技术之一是 CRISPR-Cas9 系统,它利用一种叫做 CRISPR 的 RNA 序列来引导 Cas9 核酸酶精确切割目标 DNA,从而实现基因组的编辑和修饰。定点突变作为调控基因序列技术的一种表现形式,比起传统的理化诱导或自然突变,显现出操作简便、转换效率高以及重复性可靠等显著优势。众多定点突变技术中,例如寡核苷酸引物介导的突变、聚合酶链反应(PCR)介导的突变、盒式突变方案及快速定点突变法,各有其独到之处。其中,快速定点突变法以其步骤精炼、时间高效和保真度卓越,广泛服务于多项生物工程项目。李利锋依据快速定点突变技术对微生物精氨酸脱亚胺酶的活性位点进行改造后,成功提高了其对底物的结合亲和力及催化效率,实现了基因功能的优化<sup>[97]</sup>。此外,郭笑团队<sup>[98]</sup>聚焦人类 Zeta 型谷胱甘肽硫转移酶,通过定位研究几个关键氨基酸残基的影响,发现了 Ser-14 与 Ser-15 对该酶活性发挥了至关重要的调节作用;任一残基的改变均足以引发酶活性的显著降低。可以看出,定点突变技术的逐步成熟为我们提供了一种强大的工具,并以其高效、准确的特性,在生物科学的实验探索与应用开发中发挥着不可替代的重要作用。它不仅促进了科学研究的深入,更为未来的基因工程和疾病治疗奠定了坚实的基础。

## 1.4 本研究目的意义和内容

### 1.4.1 研究目的和意义

免疫学技术具有高特异性、高敏感度及快速和便捷的优点,成为检测 AFB1 的首选方法。然而,该技术对抗体的灵敏度与特异性提出了更高的要求。伴随着分子生物学技术的飞速进步,重组单链抗体以其优良的可塑性、简化的生产过程及高效的表达产量成为科研领域的新焦点。尽管如此,相较于母本的单克隆抗体,单链抗体在亲和力方面仍显不足。本研究拟通过全合成噬菌体展示库筛选制备黄

曲霉毒素 B1 的纳米抗体，进一步结合计算机辅助建模设计实现抗体优化，为常见粮食污染生物毒素的抗体开发提供技术参考，在此基础上建立黄曲霉毒素 B1 的高效检测体系并为黄曲霉毒素 B1 的防治奠定基础，最终服务于日益严峻的粮食安全问题。

#### 1.4.2 研究内容

(1)基于全合成纳米抗体噬菌体展示库，通过亲和-洗脱-扩增-亲和的筛选方式分离出具有高度特异性噬菌体，操控噬菌体展示技术以寻找和鉴定那些能够特定结合目标抗原的候选单克隆抗体基因序列。将纳米抗体通过基因重组的方式构建至原核表达载体，在 IPTG 诱导下进行表达，通过金属亲和层析制备高纯度纳米抗体。通过 ELISA 法分析不同纳米抗体对于 AFB1 的亲合力、交叉率等，检测温度等条件对于抗体稳定性的影响。

(2)利用 SWISS-MODEL、AutoDock 等软件建立抗体-黄曲霉毒素 B1 模型，分析预测关键结合位点、氨基酸结合能等，辅助进行抗体优化。再采用定点突变对软件预测氨基酸进行优化后制备抗体蛋白，分析优化后抗体的亲合力、特异性、稳定性等性能。

#### 1.4.3 技术路线图

本研究技术路线图如下，分为两部分进行：(1)基于全合成纳米抗体库筛选制备 AFB1 纳米抗体；(2)依托计算机辅助优化 AFB1 纳米抗体

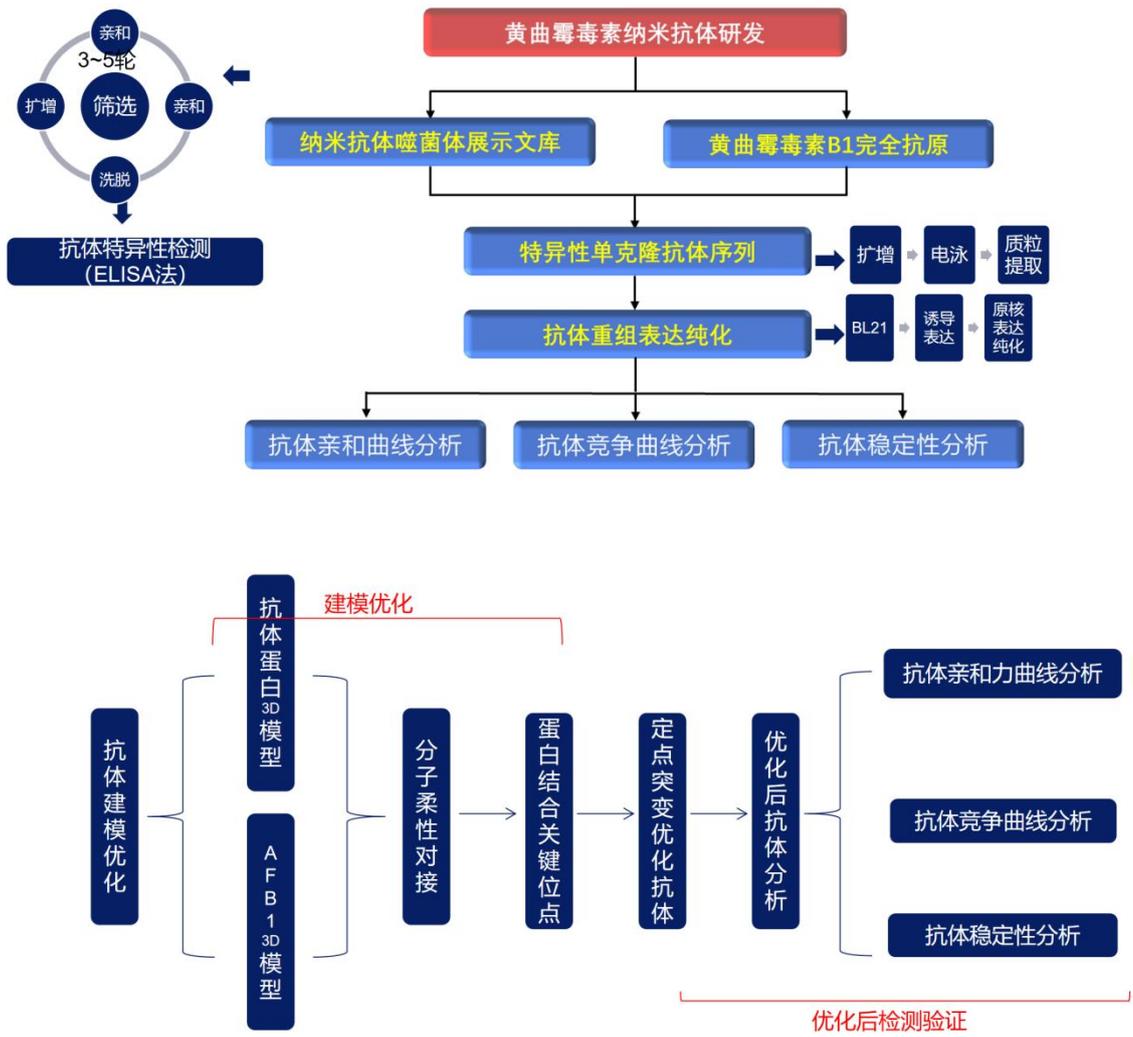


图 1.1 技术路线图(1)

Figure 1.1 Technology road map (1)

## 2 基于全合成纳米抗体库的黄曲霉毒素 B1 抗体制备

### 2.1 实验材料和仪器

#### 2.1.1 试验材料

试验所需主要材料及生产厂家如表 2.1

表 2.1 材料与试剂

Table 2-1 Materials and Reagents

试剂	生产厂家
牛血清蛋白(BSA)	上海博光生物科技有限公司
IPTG	上海碧云天生物科技有限公司
氨苄青霉素(Amp)	上海碧云天生物科技有限公司
卡那霉(Kana)	上海碧云天生物科技有限公司
脱脂奶粉	生工生物工程(上海)股份有限公司
TMB 显色液	上海碧云天生物科技有限公司
TMB 终止显色液	上海碧云天生物科技有限公司
PBS	生工生物工程(上海)股份有限公司
M13 Antibody(HRP)	北京义翘神州科技股份有限公司
Anti-HA tag 抗体	北京义翘神州科技股份有限公司
2x YT 肉汤培养基	生工生物工程(上海)股份有限公司

#### 2.1.2 仪器与设备

表 2.2 主要仪器与设备

Table 2.2 Main instruments and equipment

仪器	生产厂家
小型台式离心机	Thermo science
冷冻离心机	BECKMAN COULTER
酶标仪	美国博腾仪器有限公司
微孔洗板机	美国博腾仪器有限公司
金属浴	SCIOLOGEX
超声波破碎仪	上海微弥科技有限公司
PCR 基因扩增仪	Thermal Cycler

续表 2.2 主要仪器与设备

Continuing Table 2.2 Main instruments and equipment

仪器	生产厂家
微孔板快速震荡仪	Kylin-Bell
微型漩涡混合仪	生工生物工程（上海）股份有限公司
NANODROP ONE	Thermo science

### 2.1.3 试剂配制

(1) Tris-HCl: 适量 Tris-base, 加入去离子水进行溶解, 浓 HCl 调至需要的 pH, 置于室温储存备用。

(2) 10%过硫酸胺: 适量过硫酸胺, 加入无菌水溶解均匀, 棕色瓶 4°C 保存。

(3) 脱色液: 50 mL 冰醋酸、25 mL 乙醇, 离子水定容至 500 mL, 均匀混合。

(4) PBST: 50 mL 20×PBS 溶液加入 ddH<sub>2</sub>O 补至 1 L, 加入 0.5 mL Tween-20。

(6) PBT 溶液: 0.25 g BSA 固体加入 50 mL PBS 溶液中后加入 25 μL Tween-20 (0.05%)。

(7) PEG 8000 (20%)/NaCl (2.5 M) 溶液: 200 g PEG 8000, 146.1 g NaCl 固体加入 1 L ddH<sub>2</sub>O 中, 溶解时间长, 常过夜溶解。滤菌, 室温储存数月。

(8) 2YT 培养液: 31 g 2YT 溶于 1 L ddH<sub>2</sub>O 中, 高温灭菌, 室温储存, 根据需求可加入抗生素。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 AFB1 毒素完全抗原制备与鉴定

利用戊二醛偶联 AFB1 与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA), 将准备好的 AFB1 与 BSA 分别用磷酸盐缓冲液溶解, 充分混匀的反应液在冰浴条件下静置 15 min, 随后置于室温下继续孵育 90 min。之后缓缓滴加 1/10 体积 1 mol/L 的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[tris (hydroxymethyl)], 透析、浓缩后进行全波长扫描<sup>[99]</sup>。

### 2.2.2 AFB1 特异性噬菌体的筛选

(1) 筛选前准备: 孔板上包被 PBS 溶解稀释的抗原, 4°C 过夜每孔 100 μL。初筛常从 10 μg/mL-5 μg/mL-2 μg/mL-1 μg/mL 筛选, 降低抗原包被浓度从而获得富集高亲和力噬菌体, 另外用 BSA 作为负筛, 接种 TG1 于 30 mL 2YT 培养液中 220 rpm, 37 °C 培养约 3 h, 间断检测 OD<sub>600</sub>=0.6 后置于冰上待用。

(2)次日移除抗原, PBST 溶液洗清洗 3 次后加入200  $\mu\text{L}$  封闭液室温轻摇封闭 2 h。清洗过程确保孔中不留液体。

(3)移除封闭液, PBST 溶液清洗 3 次, 每孔加入100  $\mu\text{L}$  噬菌体库溶液, 室温轻摇孵育 1 h。先将噬菌体液加入负筛中 1 h 后再加入AFB1-BSA 孔中, 在此期间加入滤菌 PBT 溶液 100 $\mu\text{L}$ /孔保证目标抗原湿润。

(4)移除噬菌体液并用PBST 溶液清洗 20 次, 筛选轮数越高, 清洗次数越多, 第三轮基本达 40 次以上。

(5)每孔加入Glycine-HCl 溶液(pH=2.2)100  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 10 min, 用于洗脱绑定噬菌体, 并将同种抗原洗脱液加入1.5 mL Ep 管中。

(6)加入约 1/8 体积洗脱液的 Tris-HCl 溶液(pH=8)调节洗脱液 pH至中性。此为一轮筛选的 Output。

(7)将步骤(6)中 1/2 体积的噬菌体液加入5 mL 的待用TG1 溶液中 220 rpm, 37  $^{\circ}\text{C}$ 培养 0.5 h 后加入Amp<sup>+</sup> 和 M13K07 继续培养 0.5 h。

(8)将步骤(7)中 TG1 放大至 50mL 2YT/Amp/Kan 培养液中 220 rpm, 37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

(9)将过夜培养液转移至离心管中 10000 g 离心15~20 min, 转移上清液至新管中, 加入1/5 体积的 5 $\times$ PEG/NaCl 溶液后置于冰上沉淀噬菌体 30 min。

(10)10000 g, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 离心30 min, 去上清, 加入1 mL PBT 溶液重悬 并转移至1.5 mL Ep 管中, 冰上静置 30 min, 10000 rpm 离心5 min 去除不溶性杂质。

(11)以上步骤后即获得进行下一轮筛选的 Input 噬菌体库, 重复以上操作至第 3~4 轮即可获得对靶抗原亲和力较高的噬菌体。

### 2.2.3 噬菌体-酶联免疫吸附试验鉴定噬菌体上清特异性

(1)将最后一轮筛选所获噬菌体上清 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存, 96 孔板包被靶抗原(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、0.5% BSA 溶液各 100  $\mu\text{L}$ /孔 4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

(2)移除抗原, PBST 100  $\mu\text{L}$ /孔清洗 3 次。

(3)200  $\mu\text{L}$ /孔加入 5% 脱脂奶粉( BBI NON-Fat Powered Milk A600669-0 250)室温轻摇封闭 2 h。

(4)移除封闭液, PBST 100  $\mu\text{L}$ /孔清洗 3 次。加入噬菌体上清 100  $\mu\text{L}$ /孔, 室温孵育 1 h。移除上清后 PBST 清洗 3 次, 加入100  $\mu\text{L}$ /孔的二抗(抗 M13 二抗, 1:8000 稀释), 室温轻摇孵育 1 h。

(5)移除二抗, PBST 100  $\mu\text{L}$ /孔清洗 7 次。

(6)加入TMB 基底显色液 100  $\mu\text{L}$ /孔, 变色 5-10 min。

(7)加入配制的 2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100  $\mu\text{L}$ /孔停止显色反应, 酶标仪 450 nm 下测量 OD 值, 评估噬菌体特异性。

### 2.2.4 高亲和力噬菌体单克隆挑选

(1)将每轮留存的 Output 感染的 TG1 (500  $\mu\text{L}$ )在 96 孔 U 型板上倍比稀释(或者滴度测定的 96 孔板),选择适当 TG1 量的孔(常用 300~400 个/孔,根据待挑选单克隆的数量选取)加入 LB 板,先将菌棒均匀涂布在培养基面,直至产生微弱的摩擦感。随后,将其置于 37°C 的恒温培养箱内,进行过夜孵化,使细菌得以充分增殖。

(2)在 96 深孔板中加入 800  $\mu\text{L}$ /孔的 2xYT/Amp/M13k07 培养液,用黄色枪头 LB 板上的 TG1 插入孔中,轻轻摇晃,使用移液枪进行吹打,贴上透气膜 37°C, 20 rpm 过夜培养。剩下步骤同 2.2.3。最后挑选高特异性单克隆送至生工生物。

### 2.2.5 ScFv 的表达载体构建

#### 2.2.5.1 PCR 扩增筛选抗体序列

进行 DNA 测序,根据 ELISA 结果挑选高亲和力及特异性的单克隆,获得高特异性亲和力噬菌体,取 10  $\mu\text{L}$  噬菌体溶液加入含有 100  $\mu\text{L}$  TG1(OD 0.6-0.8)的 Ep 管中,然后将其送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行抗体基因 DNA 测序,从而获得核苷酸序列,通过 Gene 软件将获得的噬菌体抗体序列进行比对,挑选出正确且具有不同序列的目的基因,对目的基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增目的基因的反应体系如表 2.3

表 2.3 PCR 扩增反应体系

Table 2.3 The PCR amplification reaction system

组分 (Composition)	体积( $\mu\text{L}$ ) (Volume)
2x Rapid Tap	25
Reverse(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
Nano 1.0 Forward(10 $\mu\text{mol/L}$ )	1.0
VHH DNA	1.0
ddH <sub>2</sub> O	22

#### 2.2.5.2 琼脂糖 DNA 凝胶电泳分离抗体基因及胶回收

先配制琼脂糖凝,称取 1.2g 琼脂糖,加入 120 mL 1×TAE 溶液中,置于微波炉中高火加热 3 min,取出后加入 12  $\mu\text{L}$  的 Super red 核酸染料,倒入模具中,冷却定型,加入 PCR 扩增完成的溶液,在 130 V、40 min 条件下进行核酸电泳。使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的基因。

#### 2.2.5.3 重组质粒的构建及转化

室温放置 2min, 本实验以 Pet-25b(+)质粒作为载体, 利用限制性核酸内切酶对质粒 NcoI-HF 和 NotI-HF 对质粒进行酶切, 按照目的基因与 Pet-25b(+)载体摩尔比为 1:2, 最适插入片段使用量为(0.04×插入片段碱基对数(ng)), 最适克隆载体使用量为(0.02×克隆载体碱基对数(ng)),将目的基因与载体进行连接, 构建含有 VHH 目的基因片段的重组载体, 如表 2.4 所示

表 2.4 Pet-25b (+) 载体酶切反应体系

Table 2.4 The restriction reaction system of Pet-25b (+) carrier

组分 (Composition)	体积(μL) (Volume)
10x rCutsmart Buffer	5.0
DNA	1.0(μg)
NotI-HF	1.0
NcoI-HF	1.0
ddH <sub>2</sub> O	To 50μL

将混合好的酶切反应体系置于 PCR 基因扩增仪中进行酶切体系反应 37 °C 反应 30 min, 用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒, 针对酶切反应后的目标片段开展高效提取与纯化, 使用基于吸光值仪器 Onedrop 进行浓度测定, 进行目的基因的重组, 如表 2.5 所示。

表 2.5 目的基因重组反应体系

Table 2.5 Recombination reaction system of target genes

组分 (Composition)	体积(μL) (Volume)
VHH 片段	16 μg
Pet-25b(+) 载体	100 (μg)
Exnasell	2
5xCEIIBuffer	4
ddH <sub>2</sub> O	To 50μL

将混合好的重组反应体系置于 PCR 基因扩增仪中进行重组体系反应 37 °C 反应 15 min, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对重组产物进行回收, 使用基于吸光值仪器 Onedrop 进行浓度测定。将感受态细胞 DH5α 置于冰上解冻, 取 10 μL 重组产物的加入感受态 DH5α, 混匀后在冰上静置 30 min, 42 °C金属浴加热 90 s, 然后置于冰上冷却 3 min, 加入 900 μL 2YT 液体培养基, 放入 37 °C、220 rpm 孵箱中培养 45 min, 取 100 μL 菌液于含氨苄青霉素的 2YT 固体培养基中, 使用无菌涂布棒涂抹均匀, 置于 37 °C培养箱中倒置过夜培养 12-16 h。挑选平板上单菌落于 10 mL 含有氨苄青霉素的 2YT 液体培养基中, 放入 37 °C、

220 rpm 孵箱中培养 12~16 h, 次日, 使用无内毒素质粒小提中量试剂盒对培养好的菌液进行质粒提取, 并通过 Nanodrop 仪器进行浓度测定, 以便了解后续的转化率。将存放于-80℃冰箱中的感受态细胞 BL21pLysS 取出, 解冻后, 取 10 μL 提取的质粒加入感受态 BL21, 使用移液枪对其进行数次吹打, 便于质粒和感受态细胞混合均匀, 将溶液放置在冰上稳定 30 min, 在 42 °C 的金属浴中加热 90 s, 更好的促进下一步反应, 一旦加热结束后立刻放在冰上冷却 3 min, 加入 900 μL 2YT 液体培养基, 完成质粒的转化, 将菌液放入 37 °C、220 rpm 孵箱中摇菌 45 min, 取 100 μL 菌液于 2YT(A<sup>+</sup>) 固体培养基中, 使用无菌涂布棒涂抹均匀, 置于 37 °C 培养箱中, 倒置过夜培养。

## 2.2.6 蛋白表达条件优化

### 2.2.6.1 诱导表达时间的选择

选取纯净的单菌落, 转接于富含氨苄青霉素的 2xYT 液体培养基中(体积为 5 ml), 并在 37 °C 200r/min 的条件下进行摇床培养, 直至菌体生长达到对数生长期。接着, 向培养体系中加入异丙基-β-D-硫一步培养代半乳糖苷(IPTG)至最终浓度为 1 mmol/L, 继续在 37 °C 200r/min 的环境中进。分别在 4、8、12、16 小时后采集菌体, 并采用超声波破碎的方式提取所需表达的目标蛋白。随后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳方法, 对不同时间点诱导的抗体蛋白表达量进行定性分析。

### 2.2.6.2 最适培养温度

步骤同 2.2.6.1, 分别以 16°C、20°C、28°C、30°C、37°C 200r/min, 诱导过夜, 次日, 收集菌体, 再利用 SDS-PAGE 蛋白质凝胶电泳分析 5 种培养温度下抗体蛋白的表达情况。

### 2.2.6.3 IPTG 浓度的选择

步骤同 2.2.6.1, 在上述筛选的最佳表达条件基础上, 将不同剂量的诱导剂 IPTG 加至菌液中, 以达到 0.1、0.5、1 mmol/L 的终浓度。在 220 r/min 的搅拌速度下进行诱导培养, 随后收集菌体。采用超声波破碎的方式从中提取目标蛋白, 并通过 SDS-PAGE 凝胶电泳技术观察各浓度 IPTG 对抗体蛋白表达效果的影响。

### 2.2.6.4 蛋白超声时间的确定

步骤同 2.2.7.1, 在上述优选出的最适诱导表达条件下, 次日, 采集菌落样本, 针对目标蛋白表达情况, 分别施以 30s、1min、1min、2min 不同时间段的超声波破碎处理。随后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳技术观察各时段超声波作用下所得到的抗体蛋白的表达谱。

### 2.2.7 优化后融合蛋白的 Ni 柱亲和纯化及分析

- (1)利用低压层析系统，对含有蛋白质的溶液进行分离纯化。
- (2)使用不同浓度的洗脱液对亲和柱进行冲刷，直至有蛋白峰的出现。
- (4)使用洗脱液对蛋白洗脱，分离出所需蛋白质。
- (5)蛋白的液分离透析。
- (6)进行凝胶电泳分析。

### 2.2.8 Bradford 法测定蛋白浓度

- (1)配制牛血清白蛋白标准样品母液(1 mg/mL)，将其稀释成不同浓度，分别为 0.75、0.5、0.25、0.1、0.05 mg/mL。
- (2)取 10  $\mu$ L 不同浓度蛋白标准加入到 96 孔板的蛋白标准品中。
- (3)取 10  $\mu$ L 样品加入到 96 孔板的样品孔中，若样品不足 10  $\mu$ L，需加标准品稀释液补足 10  $\mu$ L。
- (4)用酶标仪测定各组 OD<sub>595</sub>。

### 2.2.9 纳米抗体结合率分析

孔板包被 AFB1-BSA，4°C 孵育过夜；加入 200  $\mu$ l/孔的 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h。然后，将重组抗体倍比稀释依次加入孔中，室温孵育 1 h。PBST 清洗 3 次，加入 Anti-His(HRP) 二抗室温孵育 1 h；PBST 清洗 7 次后加入 TMB 基底显色液孵育，终止反应后测定 450 nm 处的吸光度，制作结合曲线。

### 2.2.10 纳米抗体抑制率分析

孔板包被 2  $\mu$ g/ml AFB1-BSA，4°C 孵育过夜；5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h。然后，将各 50  $\mu$ l 的纳米抗体(600 nmol/L)以及倍比稀释的 AFB1(1500、750、187、46.875、11.719、2.930、0.732、0  $\mu$ mol/L)分别加入每孔中，室温下孵育 1 h。PBST 清洗 3 次后加入 Anti-His(HRP)二抗室温孵育 1 h；PBST 清洗 7 次；加入 100  $\mu$ l/孔的 TMB 基底显色液显色，终止反应后测定 450 nm 处的吸光度，制作抑制曲线。

### 2.2.11 纳米抗体交叉率分析

包被不同的粮食污染生物毒素，赭曲霉毒素 A (OTA)、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮(ZEN)被用作评价建立的 ELISA 方法的特异性，分析抗体对不同毒素的亲和效果。AFB1 的浓度为 0.1 ng/mL，其他毒素的浓度为 100 ng/mL。CR (%)=IC<sub>50</sub>(AFB1)/类似真菌毒素 IC<sub>50</sub> × 100<sup>[100]</sup>

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/538114125122006137>