

抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体的制备 及其在免疫检测方法中的应用

王宇^{1,2}, 张译丰¹, 沈玉栋¹, 陈子键¹, 刘佳², 蔡伟谊², 曾羲², 徐振林¹

(1. 广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510640)

(2. 广州市食品检验所, 广东广州 511400)

摘要: 本研究制备了一种抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体并将其应用于免疫分析方法检测食品中杀螟硫磷残留。将杀螟硫磷人工抗原免疫羊驼, 四次免疫后从外周血单核细胞获取羊驼的重链抗体可变区(VHH)基因, 构建了纳米抗体基因文库, 库容量为 10^7 cfu。通过噬菌体表面展示技术进行四轮淘筛, 得到9株不同序列的纳米抗体, 优选了灵敏度最高的Nbsm6克隆。将Nbsm6基因克隆到pINQ载体中进行定向生物素化并可溶性表达与纯化, 用于构建间接竞争酶联免疫分析方法。在最优工作条件下, 该方法检测杀螟硫磷半抑制浓度(IC₅₀)为2.0 ng/mL, 线性范围(IC₂₀~IC₈₀)为0.6~6.9 ng/mL, 检测限(IC₁₀)为0.3 ng/mL。选择白菜、生菜及橘子为样品进行添加回收实验, 样品经QuEChERS净化后稀释20倍可消除基质效应, 添加回收率在88.9%~117.4%之间, 变异系数(CV)在6.2%~16.3%之间。该方法灵敏度高, 样品前处理方便, 可用于杀螟硫磷的快速筛查。

关键词: 杀螟硫磷; 纳米抗体; 噬菌体展示; 生物素化; 酶联免疫分析

文章编号: 1673-9078(2021)08-286-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0444

Production of Anti-fenitrothion Biotinylated Nanobody and the Application in the Development of Immunoassay

WANG Yu^{1,2}, ZHANG Yi-feng¹, SHEN Yu-dong¹, CHEN Zi-jian¹, LIU Jia², CAI Wei-yi², ZENG Xi², XU Zhen-lin¹

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality & Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China) (2. Guangzhou Institute for Food Control, Guangzhou 511400, China)

Abstract: In this study, an enzyme-linked immunoassay (ELISA) based on oriented biotinylated nano-antibody was developed for the determination of fenitrothion residues in food. The nano-antibody genes was obtained from peripheral blood mononuclear cells of the alpaca after four times of immunizations based on the artificial antigens of fenitrothion. The nano-antibody gene library was constructed with the capacity of 10^7 cfu. Nine clones of nanobodies with different amino acid sequences were isolated from the library after four rounds of panning by phage display technology, of which Nbsm6 showed the highest sensitivity. The Nbsm6 gene was cloned into the pINQ vector for biotinylation expression to prepare biotinylated nano-antibody and used for the development of indirect competitive ELISA. Under the optimization condition, the proposed assay showed an IC₅₀ of 2.0 ng/mL, a detection linear range (IC₂₀~IC₈₀) of 0.6-6.9 ng/mL and a limit of detection (IC₁₀) of 0.3 ng/mL. The assay was applied to determine fenitrothion in Chinese cabbage, lettuce and orange samples. The sample was extracted and purified by QuEChERS and then diluted by 20 time to eliminate matrix effects. The recovery rate of addition was between 88.9%~117.4%, and the coefficient of variation (CV) was between 6.2%~16.3%. The proposed assay has high sensitivity and is convenient for sample pretreatment, thus can be used for rapid screening of fenitrothion.

引文格式:

王宇,张译丰,沈玉栋,等.抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体的制备及其在免疫检测方法中的应用[J].现代食品科技,2021,37(8):286-294,+285

WANG Yu, ZHANG Yi-feng, SHEN Yu-dong, et al. Production of anti-fenitrothion biotinylated nanobody and the application in the development of immunoassay [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 286-294, +285

收稿日期: 2021-04-23

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602904); 广东省科技计划项目国际合作项目(2018A050506072); 广东省普通高校重点研究项目(2019KJDXM002)

作者简介: 王宇(1982-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量与安全检测技术

通讯作者: 徐振林(1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与营养

Key words: fenitrothion; nano-antibody; phage display; biotinylation; enzyme-linked immunosorbent assay

杀螟硫磷是一种中等毒性的有机磷杀虫剂,适用于多种作物的虫害防治。杀螟硫磷会抑制乙酰胆碱酯酶活性,使得神经递质乙酰胆碱无法正常分解,从而阻断正常的神经传递引起中毒反应^[1,2]。不合理施用有机磷农药会导致人体中毒,还会污染水体和土壤,对其他动物也会产生一定的毒害作用^[3,4]。目前我国对食品中杀螟硫磷最大残留限量(MRL)规定与一些发达国家地区仍有较大差距。以蔬菜水果类为例,我国对果蔬中杀螟硫磷的MRL规定均为0.5 mg/kg(除结球甘蓝为0.2 mg/kg外);日本对不同果蔬中的杀螟硫磷MRL从0.01~10 mg/kg不等,对于未制定MRL的品种则采用0.01 mg/kg的统一标准;而欧盟对果蔬中的杀螟硫磷MRL规定则均为严格的0.01或0.02 mg/kg。虽然在一些果蔬中检出杀螟硫磷的报导中未发现超标情况^[5,6],但是与国际上一些更为严格的食品标准相比仍然容易出现超标现象^[7]。因此开发高灵敏度的杀螟硫磷检测方法对于我国进出口贸易以及相关食品标准的完善有重要意义。

目前检测杀螟硫磷的方法有仪器分析法^[8]、表面增强拉曼光谱技术^[9,10]、电化学检测法^[11,12]、荧光检测法^[13]、免疫分析法等。其中免疫分析法是仪器分析分析方法的重要补充,具有灵敏度高、特异性强、检测时间短、易操作等优点,更适用于样品的大批量快速筛查^[14,15]。目前已报道的杀螟硫磷免疫分析方法大多数是基于多克隆抗体或单克隆抗体^[16-18],其制备的周期较长,筛选过程也相对繁琐,成本较高^[19]。制备基因工程抗体只需一次成功的动物免疫即可利用微生物对抗体基因进行高通量的筛选和大规模的表达,其制备的时间及成本都将大大降低^[20]。Luo等通过核糖体展示技术得到亲和力在 $10^9\sim 10^{10}$ L/mol之间的三株抗杀螟硫磷的单链抗体(scFv),并应用到大米、黄瓜样品的检测中^[21]。

骆驼科动物或鲨鱼科动物体内含有天然缺失轻链的重链抗体亚型,通过基因工程手段制备的可变区重链抗体(VHH)即为纳米抗体(Nbs)^[22,23]。与传统抗体衍生而来的基因工程抗体如scFv和抗原结合片段(Fab)相比,Nbs由于无需重链和轻链的配对而更加容易可溶性表达且不易丢失活性^[24,25]。本研究在实验室前期制备杀螟硫磷半抗原及人工抗原的基础上^[26],用免疫后的羊驼淋巴细胞构建了抗杀螟硫磷纳米抗体基因文库。采用噬菌体展示技术淘筛得到特异性识别杀螟硫磷的纳米抗体,并通过生物素化后建立了基于生物素-链霉亲和素系统间接竞争酶联免疫分析

方法,用于对杀螟硫磷的快速灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杀螟硫磷免疫原和检测抗原由本实验室前期工作制备;pINQ载体和携带生物素连接酶基因(BirA)的PCY216载体,由乌拉圭共和国大学González-Sapienza Gualberto教授馈赠;PCR引物,广州睿博生物科技股份有限公司合成;杀螟硫磷标准品,坛墨质检科技股份有限公司;淋巴细胞分离液、生物素及辣根过氧化物酶(HRP)标记链霉亲和素(SA-HRP),北京索莱宝科技有限公司;总RNA提取试剂盒,广州捷倍斯生物科技有限公司;DNA回收试剂盒及质粒小提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒以及T4 DNA连接酶,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SfiI限制性核酸内切酶及M13KO7辅助噬菌体,NEB(北京)有限公司;rabbit-antiVHH-HRP(HRP标记的抗驼科动物VHH兔多抗),Genscript公司;牛血清白蛋白(BSA),美国Sigma公司;1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),上海源叶生物科技有限公司。

1.2 主要仪器设备

蛋白纯化仪(AKTATM Pure),美国GE公司;自动洗板机(DEM-3型),北京拓普分析仪器有限公司;PCR扩增仪(DNA Engine),美国BIORAD公司;凝胶成像系统(GDS7500型),美国BIORAD公司;电转仪(Gene Pulser Xcell),美国BIORAD公司;生化培养箱(LRH-150A),广东省医疗器械厂;酶标仪(Multiskan MK3),美国Thermo公司;超微量分光光度计(Nanodrop 2000C),美国Thermo公司。

1.3 试验方法

1.3.1 动物免疫

选用约3岁的健康雄性羊驼,在其颈背部皮下注射免疫。首次免疫用1 mg免疫原与弗氏完全佐剂混合注射;后续每两周一次加强免疫,使用0.5 mg免疫原与弗氏非完全佐剂混合注射,一共进行四次免疫。每次加强免疫一周后采集1 mL羊驼血清采用间接酶联免疫分析(ic-ELISA)检测血清免疫应答情况。

1.3.2 硫磷纳米抗体基因文库制备

采集第三、四次免疫一周后的羊驼外周血,用商业试剂盒分离淋巴细胞、提取总 RNA、合成 cDNA。以 cDNA 为模板,用引物 CALL001 (GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG) 和 CALL002 (GGTACGTGCTGTGAACTGTTCC) 进行第一次 PCR 扩增羊驼免疫球蛋白 G (IgGs) 基因,切胶回收 750 bp 条带作为第二次 PCR 模板,用引物 F-*Sfi*I (CATGCCATGACTGTGGCCCAGGCGGCCAGKTGCAGCTCGTGGAGT C) 和 R1-*Sfi*I (CATGCCATGACTCGCGGCCGCGCCTGGCCATGGGGTCTTCGCTGTGGTGC) 扩增 IgG2-VHH 基因,用引物 F-*Sfi*I 和 R2-*Sfi*I (CATGCCATGACTCGCGGCCGCGCCTGGCCGTCTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG) 扩增 IgG3-VHH 基因。用限制性核酸内切酶 *Sfi*I 酶切 pComb3Xss 噬菌粒载体和 VHH 基因, T4 连接酶连接 VHH 基因和 pComb3X 载体片段,将酶连产物电击转化至 *E.coli* TG1 得到纳米抗体基因文库,经辅助噬菌体 M13KO7 救援后得到噬菌体展示文库,用于纳米抗体文库阳性克隆淘筛。

1.3.3 杀螟硫磷纳米抗体淘筛

杀螟硫磷纳米抗体基因文库采取“同时竞争”策略^[27]进行四轮淘筛。杀螟硫磷抗原用碳酸缓冲液稀释 (1000、500、250、125 ng/mL),在酶标板中 (每孔 0.1 mL) 4 °C 包被过夜。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗去游离抗原,用 3% BSA-PBS 封闭 1 h。噬菌体展示库中添加 1% BSA (W/V),转移到固定化抗原的微孔中 (每孔 0.1 mL),37 °C 孵育 1 h,用 PBS-0.05% 吐温 20 (PBST) 洗去游离的噬菌体。每孔加入 0.1 mL 甘氨酸-盐酸 (0.1 mol/L, pH 2.2),37 °C 孵育 10 min 后,收集洗脱液到离心管中,加入 1 mol/L Tris 溶液中和,添加杀螟硫磷标准溶液至目标浓度 (500、100、20、4 ng/mL) 后重新分配到新的微孔中 (每孔 0.1 mL) 竞争反应 1 h,收集微孔中液体即为输出噬菌体 (output)。用一半的 output 噬菌体侵染 *E.coli* TG1 扩增噬菌体用于下一轮淘筛;另外一半 output 噬菌体取 10 μL 侵染 *E.coli* TG1 并涂布氨苄西林平板测滴度,剩余噬菌体保存在 -20 °C。从第三、四轮的 output 滴度平板中挑取单菌落用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达,通过 ic-ELISA 检测菌液上清。选取药物空白吸光值 (OD_{450 nm}) 大于 0.5,且杀螟硫磷抑制率 (100 ng/mL) 超过 50% 的候选克隆进行基因测序。

1.3.4 杀螟硫磷纳米抗体的制备及定向生物素化

从 *E.coli* TG1 中提取 pComb3X-sm6 表达载体作

为模板,以 F-*Sfi*I 和 R1-*Sfi*I 为引物 PCR 扩增 sm6-*Sfi*I 基因。扩增得到的 sm6-*Sfi*I 基因和 pINQ 载体分别用 *Sfi*I 限制性核酸内切酶进行酶切, T4 连接酶进行连接,得到 pINQ-sm6 表达载体。将 pComb3X-sm6 表达载体转化到 *E.coli* BL21 内,在氨苄西林培养基 (LB-Amp) 中培养至对数期,加入 IPTG (1 mmol/L) 诱导表达过夜;将 pINQ-sm6 表达载体转化到含有携带 BirA 基因的 PCY216 载体的 *E.coli* BL21 内,在含有卡那霉素、氯霉素、阿拉伯糖和生物素的 LB 培养基中培养至对数期,加入 IPTG (3 μmol/L) 诱导表达过夜^[27]。诱导表达后离心收集细胞,用 PBS 分散细胞后用高压破碎仪破碎细胞。由 pComb3X 表达的 Nbsm6 可直接用 Ni-NTA 纯化;由 pINQ 表达的抗体 37 °C 震荡 2 h 进行生物素化后,用 Ni-NTA 纯化生物素化纳米抗体 (Nbsm6-bt)。

1.3.5 纳米抗体生物素化前后 ic-ELISA 灵敏度比较

将纯化得到的杀螟硫磷纳米抗体及生物素化纳米抗体用于 ELISA 方法建立,具体步骤如下:将杀螟硫磷检测抗原用碳酸缓冲液稀释后加入酶标板中 (100 μL 每孔),4 °C 孵育过夜,用 PBST 洗板后用蛋白封闭液封闭。将杀螟硫磷纳米抗体和生物素化纳米抗体用 PBS 稀释至工作浓度,并将 50 μL 抗体工作溶液与 50 μL 不同浓度杀螟硫磷标准溶液在微孔中混合 (n=3),室温孵育 30 min,然后洗板 5 次。用 PBST 稀释 rabbit-antiVHH-HRP 二抗以及 SA-HRP,分别加入孵育杀螟硫磷纳米抗体及生物素化纳米抗体的微孔中 (100 μL 每孔),37 °C 孵育 30 min,洗板 5 次。加入四甲基联苯胺 (TMB) 显色液,37 °C 孵育 10 min,加入 10% 硫酸 (V/V) 终止反应,用酶标仪测 450 nm 吸光值 (OD_{450 nm})。抗原抗体最佳工作浓度通过棋盘滴定法测定,在优化的抗原、抗体浓度下比较两种抗体 ELISA 的 IC₅₀。

1.3.6 方法特异性

采用 ic-ELISA 分别绘制杀螟硫磷结构类似物的标准曲线 (甲基对硫磷,对硫磷,毒死蜱,啶硫磷,甲基嘧啶磷,马拉硫磷,2-硝基甲苯,3-甲基-4-硝基苯酚),得到每种结构类似物 IC₅₀ 值,通过式 (1) 计算各结构类似物与抗杀螟硫磷纳米抗体的交叉反应率,以评价其特异性。

$$\text{交叉反应率 (CR\%)} = \frac{\text{杀螟硫磷 IC}_{50}}{\text{结构类似物 IC}_{50}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.7 实际样品检测

样品前处理方法参考 GB 23200.113-2018 进行:白菜、生菜去除根部,橘子去柄后,分别打成匀浆,

准确称取 10 g 样品于 50 mL 离心管，加入 10 mL 乙腈、4 g 硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠、0.5 g 柠檬酸氢二钠以及 1 颗陶瓷均质子，震荡 1 min 后 4200 r/min 离心 5 min。吸取 6 mL 上清液到 15 mL 塑料离心管中，加入 885 mg 硫酸镁、150 mg 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶 (PSA) 及 15~45 mg 石墨化炭黑 (GCB)，涡旋混匀 1 min，4200 r/min 离心 5 min。净化后的样品用 PBS 稀释后直接用于 ic-ELISA 检测。

1.3.8 数据处理

免疫进程中羊驼血清抑制率通过式 (2) 计算。杀螟硫磷抑制曲线通过 origin 软件拟合：以药物浓度的对数值为横坐标，对应的值 (B) 与药物空白吸光值 (B₀) 的比值 (B/B₀) 为纵坐标绘制散点图，通过 Logistics 函数拟合抑制曲线。

$$\text{抑制率} / \% = \frac{\text{OD}_{\text{药物空白}} - \text{OD}_{\text{药物抑制}}}{\text{OD}_{\text{药物空白}}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

2.1 羊驼免疫及纳米抗体基因文库构建

如图 1 所示，杀螟硫磷半抗原结构由实验室前期工作合成^[26]，其结构如 (a, 左) 所示。半抗原与 EDC、NHS 在 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中形成活泼酯 (a, 右)，将活化后的半抗原与乳铁蛋白 (LF) 在碳酸缓冲液 (CB) 体系中偶联，合成免疫原 (b) 用于羊驼免疫。羊驼免疫的进程中，随着免疫次数的增加，血清效价的抑制率逐渐提高，第三、四次免疫效果基本稳定，血清在 1:8000 倍稀释，100 ng/mL 杀螟硫磷下抑制率在 83% 左右 (c)。因此选择第三第四次免疫的羊驼外周血进行淋巴细胞分离和基因文库构建。用 pComb3X-VHH 表达载体分多次电击转化合计 0.5 mL 的 *E.coli*TG1，通过平板计数算得基因文库的库容量为 10⁷ cfu 数量级；随机挑选 48 个克隆测序，未发现重复序列，说明所得纳米抗体基因文库的多样性良好。经辅助噬菌体救援后，所得噬菌体文库滴度为 10¹² pfu/mL。

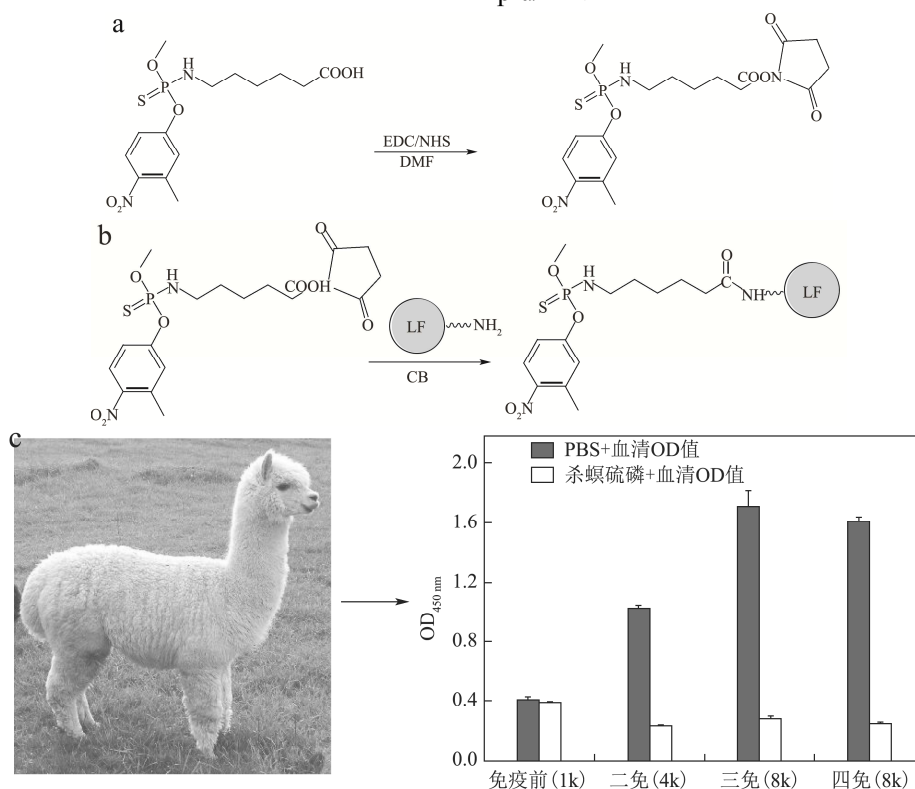


图 1 人工抗原制备及羊驼免疫进程中血清效价和抑制率变化

Fig.1 Preparation of artificial antigen and changes of serum titer and inhibition rate during immunization in alpaca

注：(a) 半抗原活化；(b) 偶联载体蛋白；(c) 免疫应答情况。

2.2 杀螟硫磷纳米抗体的淘选

采用固相吸附法对噬菌体文库进行 4 轮淘选。淘选原理为：噬菌体展示库中具有抗原结合活性的克隆先与固定化抗原充分结合，然后洗涤微孔弃去非特异

性的克隆或结合力较弱的克隆；用酸性洗脱液使阳性克隆脱离固定化的抗原并及时中和洗脱液酸洗，以免噬菌体因衣壳蛋白过度变性而丧失侵染能力；然后往中和的洗脱液中添加杀螟硫磷，再重新投入固定化抗原微孔中，使游离的杀螟硫磷和固定化抗原同时竞争

大小为 19.5 ku。两种纳米抗体分子量的差异主要是由于两种载体的融合标签片段不同。由于纳米抗体表达后被转运到细胞周质，而生物素连接酶在细胞质中表达，因此需要将细胞破碎，使纳米抗体与生物素连接酶接触，才能保证生物素化顺利完成。

通过棋盘滴定法优化 Nbsm6 和 Nbsm6-bt 的抗原抗体工作浓度。经过优化，两种抗体均在 500 ng/mL 抗原浓度下半抑制浓度 (IC₅₀) 值最小，其中 Nbsm6 的工作浓度为 50 ng/mL，Nbsm6-bt 工作浓度为 25 ng/mL，利用定点生物素化纳米抗体与链霉菌亲和素-HRP 的信号放大策略后，在相同的抗原浓度条件下 Nb 工作浓度降低一倍。在优化后的抗原抗体工作浓度下建立两种抗体的标准曲线 (图 3)，其中 Nbsm6 的 IC₅₀ 为 4.0 ng/mL，与此前的表征结果基本吻合，在误差范围内，检出限 (IC₁₀) 为 0.8 ng/mL，线性范围为 1.5~10.9 ng/mL；Nbsm6-bt 的 IC₅₀ 为 2.1 ng/mL，检出限为 0.3 ng/mL 线性范围为 0.6~6.9 ng/mL，运用信号放大策略的 ELISA 方法灵敏度约提升为原来的 2 倍。

本研究建立的基于定向生物素化纳米抗体的 ELISA 方法与已有报导的基于单克隆抗体或多克隆的抗体 ELISA 方法相比具有更高的灵敏度^[18,32,33]，与已报导的杀螟硫磷 scFv 灵敏度接近^[21]。

2.4 方法特异性

用 ic-ELISA 鉴定 Nbsm6-bt 对几种结构类似物的 IC₅₀ 值，并计算与杀螟硫磷的交叉反应率。如表 1 所示，可能由于杀螟硫磷与甲基对硫磷架构极其相似，

只有苯环上一个甲基的差别，因此甲基对硫磷有较高的交叉反应率，为 19.7%；对硫磷的交叉反应率为 2.0%，其余结构类似物几乎没有交叉反应。已有报导的杀螟硫磷单克隆抗体多为广谱抗体，且检测杀螟硫磷灵敏度较低^[17,18,34]。基于本研究制备的杀螟硫磷纳米抗体所建立的免疫分析方法在特异性检测杀螟硫磷方面更具有优势。

2.5 样品添加回收

大白菜、生菜、橘子样品提取液经过 QuEChERS 净化后，为了简化前处理步骤、缩短检测时间，不经过氮吹复溶，直接用 PBS 稀释后进行 ELISA 检测。经稀释倍数优化发现，三种蔬菜水果样品提取液稀释 20 倍后标准曲线 (◆) 与 PBS 标曲 (■) 基本重合，而稀释 2、5、10 倍后的样品稀释液标曲与 PBS 标曲重合度差，会影响样品中杀螟硫磷定量效果，因此确定 20 倍稀释为消除基质效应的最小稀释倍数。检测线性范围为 12~138 μg/kg，既可通过增大样品稀释倍数来满足国家标准 GB 2763-2019 中规定的 500 μg/kg 最大限量标准的检测，也能满足部分国家地区更严格的标准限量检测要求。

在样品中添加低中高三个水平的杀螟硫磷标准药物，采用上述的前处理方法处理样品，ic-ELISA 检测样品中的杀螟硫磷，结果如表 2 所示，三种果蔬样品的回收率在 88.9%~117.4%之间，变异系数 (CV) 值在 6.2%~16.3%之间，说明方法准确性较高，误差在可接受范围。

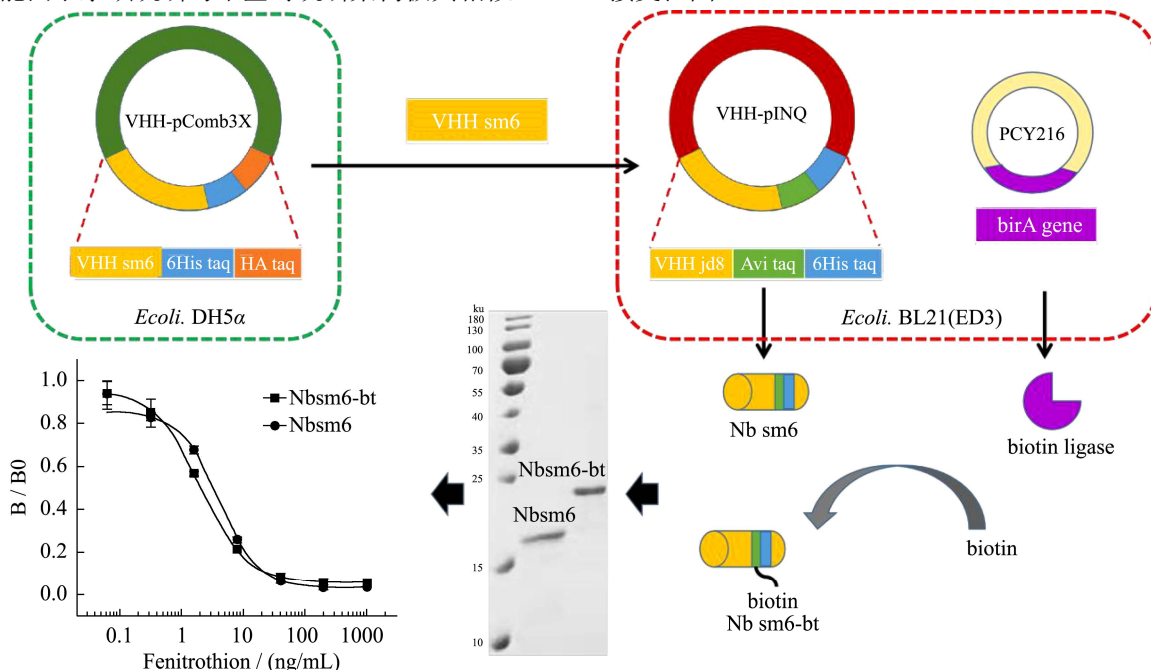


图 3 定向生物素化杀螟硫磷纳米抗体制备及表征

Fig.3 Preparation and characterization of oriented biotinylation anti-fenitrothion Nbs

表 1 icELISA 检测杀螟硫磷结构类似物交叉反应

Table 1 Cross reaction of analogue of fenitrothion detection using icELISA

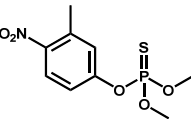
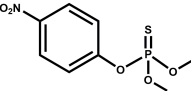
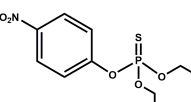
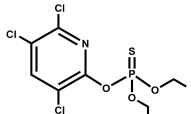
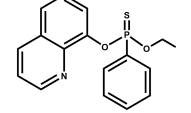
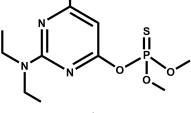
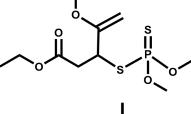
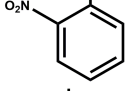
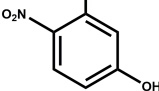
Analyte	Structure	IC ₅₀ /(ng/mL)	Cross reactivity/%
Fenitrothion		2.1	100
Parathion-Methyl		10.7	19.7
Parathion		103.2	2.0
Chloroyrifos		>10000	<0.1
Quintofos		>10000	<0.1
Pirimiphos-Methyl		>10000	<0.1
Malathion		>10000	<0.1
2-Nitrotoluene		>10000	<0.1
3-Methyl-4-Nitrophenol		>10000	<0.1

表 2 几种蔬菜水果样品添加回收实验

Table 2 Additive recovery experiment of vegetable and fruit samples

Sample	Spiked/(μg/kg)	Mean±SD (μg/kg, n=3)	Recovery rate/%	CV/%
Chinese cabbages	15	16.0±1.7	106.8	10.5
	45	46.7±3.5	103.7	7.5
	135	131.4±16.7	97.3	12.7
Lettuce	15	15.6±2.1	104.1	13.3
	45	44.7±7.3	99.4	16.3
	135	158.5±19.6	117.4	12.4
Tangerine	15	16.3±1.5	108.5	9.4
	45	48.0±7.2	106.7	15.0
	135	120.0±7.2	88.9	6.2

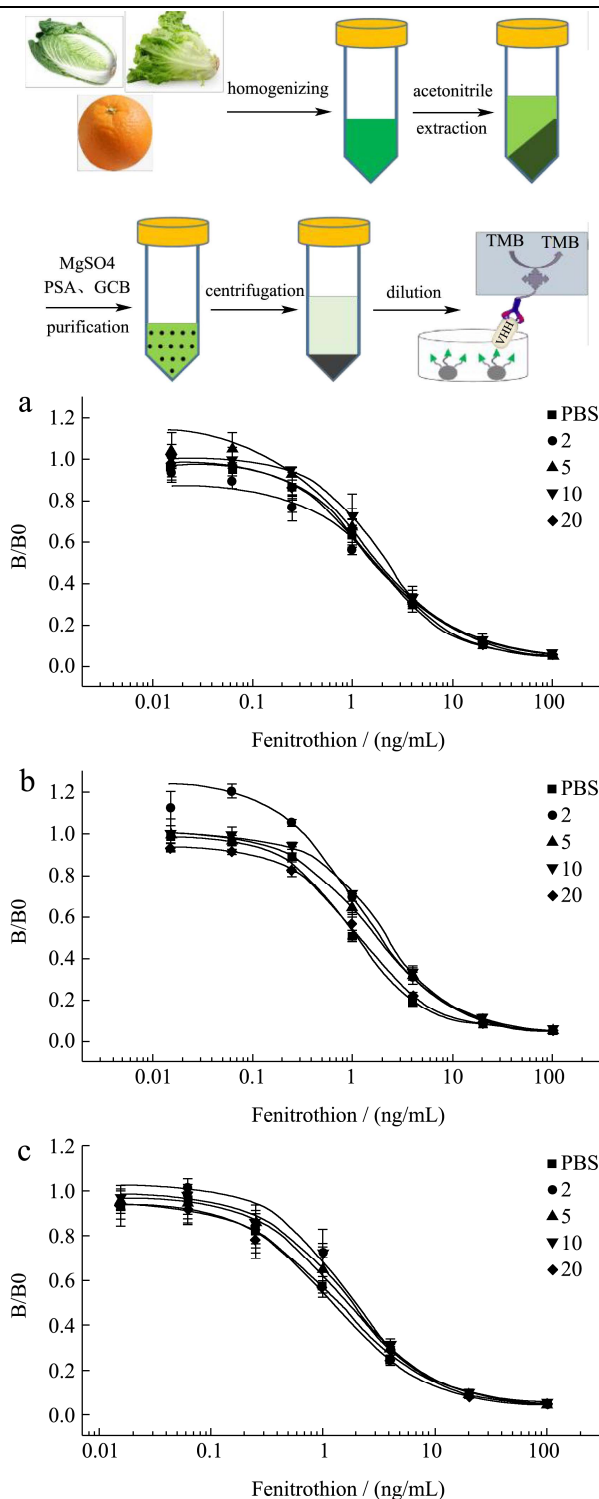


图4 基质效应的消除

Fig.4 Elimination of matrix effect

注: (a) 大白菜样品; (b) 生菜样品; (c) 橘子样品。

3 结论

本研究报道了一种抗杀螟硫磷生物素化纳米抗体的制备方法及其在免疫分析方法的应用。相对于传统单克隆或多克隆抗体, 纳米抗体在稳定性及批量制备等方面具有较好的优势。通过定向生物素化, 可以避

免化学方法生物素化带来的批间差异大、性能不均一等问题, 解决后续应用存在方法稳定性较差等问题。基于生物素化纳米抗体建立的杀螟硫磷间接竞争ELISA方法, 灵敏度高, 因此样品前处理可以采用简单的稀释法来消除干扰, 免去复杂的样品净化过程。综上所述, 本文建立的及与生物素化纳米抗体的杀螟硫磷免疫分析方法具有灵敏度高、可靠性好、操作简便等特点, 可作为食品中杀螟硫磷残留快速筛查的工具。

参考文献

- [1] Slotkin Theodore-A, Levin Edward-D, Seidler Frederic-J. Comparative developmental neurotoxicity of organophosphate insecticides: effects on brain development are separable from systemic toxicity [J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114(5): 746-751
- [2] Vale Allister. Organophosphorus insecticide poisoning [J]. Clinical Evidence, 2015; 11: 2102
- [3] 张少恩, 桑丽雅, 王振国, 等. 有机磷农药快速检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9): 2629-2633
ZHANG Shao-en, SANG Li-ya, WANG Zhen-guo, et al. Research progress on rapid detection methods of organophosphorus pesticides [J] Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(9): 2629-2633
- [4] 陈岩, 赵洁, 刘雯雯, 等. 我国主要水果农药登记现状及残留限量标准研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(17): 6169-6177
CHEN Yan, ZHAO Jie, LIU Wen-wen, et al. Investigation of the registration status and residue limit standard of pesticides used in main fruits of China [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(17): 6169-6177
- [5] 于锐, 刘景双, 王其存, 等. 长春市郊区蔬菜有机磷农药残留与健康风险评估[J]. 环境科学, 2015, 36(9): 3486-3492
YU Rui, LIU Jing-shuang, WANG Qi-cun, et al. Contamination of organophosphorus pesticides residue in fresh vegetables and related health risk assessment in Changchun, China [J]. Environmental Science, 2015, 36(9): 3486-3492
- [6] 钟平生, 吴丽珍. 惠州市十字花科蔬菜有机磷农药残留调查初报[J]. 广东农业科学, 2010, 37(8): 246-249
ZHONG Ping-sheng, WU Li-zhen. Residue determination of organophosphorus pesticide in cruciferae vegetable in Huizhou [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 37(8): 246-249
- [7] 刘永明, 葛娜, 崔宗岩, 等. 进口粮谷中农药残留状况普查与

- 分析[J].食品安全质量检测学报,2016,7(3):1233-1239
- LIU Yong-ming, GE Na, CUI Zong-yan, et al. Survey and analysis for pesticide residues in the imported grain [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(3): 1233-1239
- [8] Malhat Farag, Boulangé Julien, Abdelraheem Ehab, et al. Validation of QuEChERS based method for determination of fenitrothion residues in tomatoes by gas chromatography-flame photometric detector: decline pattern and risk assessment [J]. Food Chemistry, 2017, 229: 814-819
- [9] 陈文,朱莉娅,韩宇,等.表面增强拉曼光谱技术应用于西瓜中杀螟硫磷农药残留的检测[J].食品科技,2018,43(1):320-325
- CHEN Wen, ZHU Li-ya, HAN Yu, et al. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy to the detection of fenitrothion pesticide residues in watermelon [J]. Food Sci Tech, 2018, 43(1): 320-325
- [10] 黄林生,王芳,翁士状,等.表面增强拉曼光谱准确检测玉米中杀螟硫磷农药残留[J].光谱学与光谱分析,2018,38(9): 2782-2787
- HUANG Lin-sheng, WANG Fang, WENG Shi-zhuang, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for rapid and accurate detection of fenitrothion residue in maize [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(9): 2782-2787
- [11] Geremedhin Welesamel, Amare Maereg, Admassie Shimelis. Electrochemically pretreated glassy carbon electrode for electrochemical detection of fenitrothion in tap water and human urine [J]. Electrochim Acta, 2013, 87: 749-755
- [12] Ensafi Ali A, Noroozi Rasool, Zandi Atashbar Navid, et al. Cerium (IV) oxide decorated on reduced graphene oxide, a selective and sensitive electrochemical sensor for fenitrothion determination [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 245: 980-987
- [13] Nebu John, Anjali Devi J S, Aparna R S, et al. Fluorescence turn-on detection of fenitrothion using gold nanoparticle quenched fluorescein and its separation using superparamagnetic iron oxide nanoparticle [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 277: 271-280
- [14] YAO Jing-jing, WANG Zhong-xing, GUO Ling-ling, et al. Advances in immunoassays for organophosphorus and pyrethroid pesticides [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2020, 131: 116022
- [15] QIE Zhi-wei, HUANG Zi-wei, GAO Zi-chen, et al. Pretreatment-integration for milk protein removal and device-facilitated immunochromatographic assay for 17 Items [J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 11630
- [16] YU Ji-cheng, GUO Ting-ting, ZHANG Wei, et al. Simultaneous detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and fenitrothion through lanthanide doped β -NaYF₄ upconversion nanoparticles with different emitting light colors [J]. Materials Research Bulletin, 2019, 111: 133-139
- [17] ZOU Ru-bing, CHANG Yun-yun, ZHANG Tian-yi, et al. Up-converting nanoparticle-based immunochromatographic strip for multi-residue detection of three organophosphorus pesticides in good [J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7(18): 1-10
- [18] Jiao S, Liu P, Liu Y, et al. Binding properties of broad-specific monoclonal antibodies against three organophosphorus pesticides by a direct surface plasmon resonance immunosensor [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(28): 7263-7273
- [19] SUN Zhi-chang, DUAN Zhen-hua, LIU Xing, et al. Development of a nanobody-based competitive dot ELISA for visual screening of ochratoxin A in cereals [J]. Food Analytical Method, 2017, 10(11): 3558-3564
- [20] Jørgensen Mathias Lindh, Friis Niels anton, Just Jesper, et al. Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae* [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 9
- [21] LUO Yi-hui, XIA Yu-xian. Selection of single-chain variable fragment antibodies against fenitrothion by ribosome display [J]. Analytical Biochemistry, 2012, 421(1): 130-137
- [22] Wolfson W. Ablynx makes nanobodies from llama bodies [J]. Chemistry & Biology, 2006, 13(12): 1243-1244
- [23] Dooley H. Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display [J]. Molecular Immunology, 2003, 40(1): 25-33
- [24] Gonzalez-Sapienza Gualberto, Rossotti Martin A, Tabares-Da Rossoti Sofia. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 977
- [25] Zarebski Laura M, Urrutia Mariela, Goldbaum F ernando A. Llama single domain antibodies as a tool for molecular mimicry [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 349(4): 814-824
- [26] CHEN Zi-jian, HUANG Zhi-cheng, HUANG Song, et al. Effect of protein on the oxidase-like activity of CeO₂ nanozymes for immunoassays [J]. Analyst, 2021, 146(3): 864-873