



金抗体替代 ELISA 中的天然抗体用于溶菌酶检测*

许艳娇** 李文浩** 高天歌 曹傲能***

(上海大学纳米化学与生物学研究所, 上海 200444)

摘要 **目的** 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 被广泛用于抗体或抗原的检测, 并被视为临床实践中的金标准, 可提供相对可靠、灵敏和特异的检测结果。ELISA 的本质是抗原与相应抗体之间的特异性相互作用。然而, 天然抗体固有的不稳定性是 ELISA 的一个难以克服的弱点, 并可能导致检测结果的重现性差甚至错误的诊断结果。本课题组先前应用构象工程方法开发了一种基于金纳米粒子的人工抗体 (简称金抗体)。金抗体可以像天然抗体一样特异性地与抗原相互作用, 并且具备远优于天然抗体的稳定性。出色的稳定性使金抗体可能成为天然抗体更好的替代物, 用于 ELISA 中。**方法** 经过必要的优化并与辣根过氧化物酶 (HRP) 耦联后, 制得酶标金抗体 10HRP-(Au-400P1), 然后用酶标金抗体代替天然酶标抗体用于 ELISA 检测中。**结果** 通过一系列的实验证明, 抗溶菌酶金抗体可用于 ELISA 特异性检测 1~16 mg/L 范围内的鸡蛋清溶菌酶 (HEWL) 样品。**结论** 金抗体可以替代天然抗体用于 ELISA 检测, 并具有优于传统 ELISA 法的检测准确性和一致性。

关键词 金抗体, 酶联免疫吸附测定, 构象工程, 抗体, 溶菌酶

中图分类号 Q819, R446.61

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0293

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 最早由 Engvall 和 Perlmann 于 1971 年开发出来^[1]。ELISA 可用于抗体、抗原 (包括蛋白质、多肽和其他分子) 的检测和定量。经历一系列优化开发、自动化和商业化^[2-5], ELISA 已成为世界各国研究和诊断实验室的常规方法^[4, 6-7], 广泛应用于疾病诊断^[8]、食品安全检测^[9]、环境检测^[10]等领域^[11-12]。

随着 ELISA 在临床、食品安全和环境等领域发挥着越来越重要的作用, 现在几乎所有的实验室在分析时都直接或间接地使用 ELISA^[9]。在正确严谨的操作下, ELISA 可以为科学研究和临床诊断提供高度可重复的定量数据。然而, ELISA 的检测完全依赖于抗体的活性, 而天然抗体固有的不稳定缺点也给 ELISA 检测带来一系列问题。首先, 特异性单克隆抗体的生产仍极具挑战性^[13], 抗体生产的批次不同就可能造成抗体的活性区别和检测结果的差异。此外, 作为天然蛋白质的抗体可能会由于温度、pH 或化学诱导的变化而失去其活性^[14-15]。这些缺点都在一定程度上限制了 ELISA 的应用范

围和环境。

本课题组前期发展了一种构象工程方法^[16], 通过将天然抗体蛋白中的互补决定区 (CDR) 片段嫁接到金纳米粒子 (AuNPs) 上, 并成功在金纳米粒子上重建了 CDR 片段在原天然抗体中的构象, 制备了一种全新的、可像原天然抗体一样特异性识别原抗原的纳米人工抗体, 简称为金抗体 (goldbody)^[16]。其中, 抗溶菌酶金抗体就是将天然抗体 cAb-lys3 的 CDR3 区域经适当改造后得到多肽 P1, P1 肽通过其两端的半胱氨酸以两个 Au-S 键连接到金纳米粒子上而制得。尽管自由的 P1 肽不具备和溶菌酶结合的能力, 经构象重构后得到的抗溶菌酶金抗体可以像天然抗体 cAb-lys3 一样与溶菌酶特异性结合, 并抑制溶菌酶的活性^[16-17]。根据

* 国家自然科学基金 (31871007, 22071145) 和国家科技部重点研发计划 (2016YFA0201602) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 021-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

收稿日期: 2021-09-28, 接受日期: 2021-11-29

基于此工作提出的“限域下最低能量结构片段”(CLEF)假说^[18-19], 该技术可以作为一种普适的方法开发更多的识别不同抗原的金抗体。金抗体可以像天然抗体一样特异性地与抗原相互作用, 并且具备远优于天然抗体的稳定性^[16]。金抗体经煮沸1 h、冷却后仍然保持绝大部分活性。Willson教授在F1000Prime推荐此工作的文章中^[20], 还专门为该技术造了一个新词“goldization”, 将其与治疗抗体中的人源化(humanization)相比拟, 暗示该技术的广泛应用前景。作为金抗体应用的探索, 在此首次研究了以金抗体代替天然抗体用于ELISA检测, 可以克服天然抗体的不稳定性缺点。

ELISA有多种检测类型, 其中最简单的就是直接法^[21-23]。直接法直接将抗原固定(包被, coating)在孔板上, 而把辣根过氧化物酶(HRP)连接到特异性识别抗原的抗体(一抗)(图1a)。

直接法的缺点之一是要把HRP连接到一抗, 检测不同的抗原就需要把HRP连接不同的一抗, 因而生产和使用成本较高。针对这一缺点, 间接法(图1b)把HRP连接到识别一抗的二抗上, 由于HRP-二抗的通用性而降低使用成本。本工作中, 金抗体用于ELISA的方案设计(图1c)参考直接法和间接法原理, 针对蛋清溶菌酶(HEWL)抗原, 以抗溶菌酶金抗体作为一抗, 通过带巯基的PEG先与HRP共价连接制得HRP-PEG-SH, 然后利用HRP-PEG-SH上巯基高效与金纳米粒子反应的特性, 将HRP-PEG-SH连接到金抗体上。因此, HRP-PEG-SH可作为一个相当于HRP-二抗的产品, 具有通用性, 可以用于未来不同抗原的检测。因而这一金抗体ELISA兼具直接法和间接法ELISA的部分特点和优势。

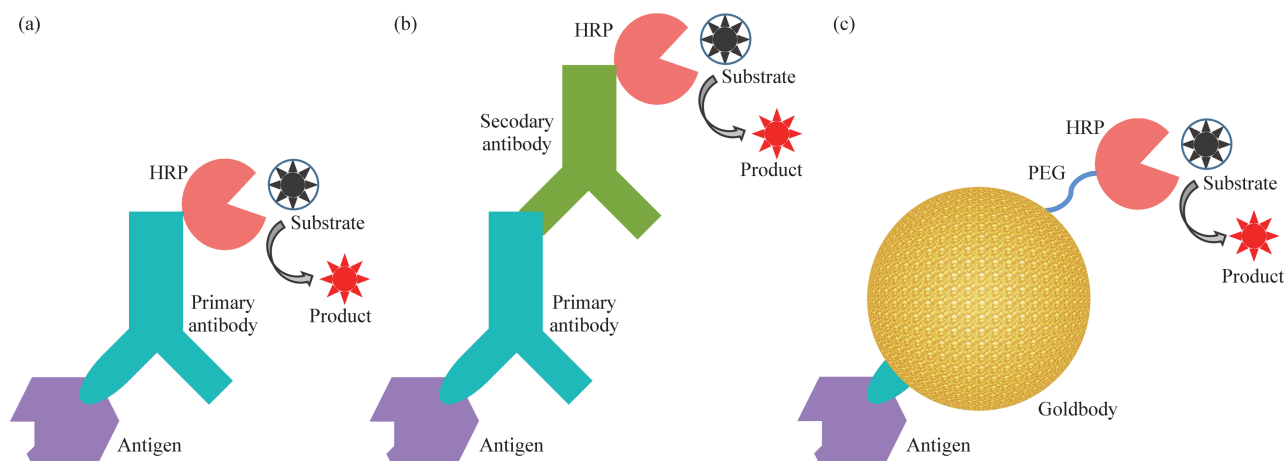


Fig. 1 Schematic diagram of the application of goldbody in ELISA

(a) Schematic diagram of direct ELISA. (b) Schematic diagram of indirect ELISA. (c) Schematic diagram of application of goldbody in ELISA.

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氯金酸、柠檬酸三钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸钠、碳酸氢钠、硫酸、过氧化氢和氢氧化钠购于国药集团化学试剂有限公司(中国)。1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。巯基聚乙二醇羧基(HS-PEG(5K)-COOH)购于上海芃硕生物科技有限公司。溶壁微球菌购于生工生物工程上海股份有限公司。鸡蛋清溶菌酶(HEWL)、核糖核酸酶A

(RNase A)、牛血清白蛋白(BSA)和辣根过氧化物酶(HRP)购自Sigma-Aldrich(美国)。检测溶菌酶ELISA试剂盒(F81004-A)购自凡科维公司(上海)。多肽P1(其氨基酸序列为CGSTIYASYYESGHGC)由上海科肽生物技术有限公司合成。紫外可见光谱于U-3010型光谱仪(日本HITACHI公司)上测定, 电镜照片于HT7700(透射电子显微镜日本Hitachi公司)上拍摄, ELISA检测于Varioskan Flash多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)上进行。

1.2 聚乙二醇耦联辣根过氧化物酶

使用经典的EDC-NHS反应将HS-PEG(5K)-

COOH与HRP耦联。具体步骤如下：分别称取1.2 mg HS-PEG-COOH溶于6 ml磷酸盐缓冲液(40 mmol/L, pH 7.4)，称取10 mg NHS溶于50 μ l超纯水，称取10 mg EDC溶于50 μ l超纯水，称取8 mg HRP溶于2 ml超纯水。在4℃搅拌下，将30 μ l EDC溶液滴加至5 ml HS-PEG-COOH溶液中，避光反应10 min后，加入30 μ l NHS溶液避光反应30 min，将2 ml HRP溶液滴加至混合溶液，避光反应过夜。反应完毕后使用截留分子质量为10 ku的超滤管，在10℃ 300 r/min的条件下离心超滤除去未反应物，并用磷酸盐缓冲液洗涤3次，将所得上清液进行冷冻干燥，得到最终产物即为HRP-PEG-SH。

1.3 酶标金抗体的合成与优化

金纳米粒子的合成：课题组前期抗溶菌酶金抗体的工作主要利用3.6 nm的金纳米粒子合成，因为尺寸小的金纳米粒子可以有更高的摩尔浓度^[16]。本工作中，首先测试了3.6 nm金抗体的适用性(附件图S1~S4)，最终选择了13 nm金纳米粒子。13 nm金纳米粒子按如下方法合成：在500 ml圆底烧瓶中加入240 ml超纯水及25 ml 39.47 mmol/L柠檬酸三钠溶液后置于120℃恒温油浴中。冷凝回流，反应20 min后，迅速加入10 ml 25 mmol/L氯金酸溶液。均匀搅拌约5 min后取出，自然冷却至室温，即得13 nm金纳米粒子(附件图S5~S8)。

金抗体的合成与优化：根据课题组前期工作，多肽可通过Au-S键高效固定在金纳米粒子表面^[16]。为确定13 nm AuNPs表面可耦联P1多肽的最大数量，将过量P1与AuNPs反应，利用P1的固有荧光，检测超滤后未反应的游离肽(附件图S9)，平均每个AuNP上耦联P1的最大数量为679，即多肽密度优化时上限是679。首先将制得的13 nm金纳米粒子使用0.22 μ m过滤膜除去可能的大颗粒杂质。然后将10 μ l 0.2 mol/L柠檬酸三钠溶液加入到6 ml过滤后的AuNPs中，室温下搅拌均匀。接着将2 ml不同浓度的P1多肽溶液(根据吸光度定浓度，多肽P1消光系数为2.706 L/g)逐滴加入至上述溶液，避光搅拌反应过夜，即可得到不同多肽密度的抗溶菌酶金抗体。最后通过金抗体抑制溶菌酶活性实验确定最佳多肽密度。

酶标金抗体的合成与优化：酶标金抗体采取与制备金抗体相近方法，从金纳米粒子直接合成。先将1 ml多肽溶液(按照优化浓度后的浓度)逐滴加到AuNPs与柠檬酸三钠溶液混合溶液中，室

温下避光反应1 h后，将不同浓度的1 ml HRP-PEG-SH溶液逐滴滴加至上述溶液中，同样通过Au-S键将HRP-PEG-SH固定在金纳米粒子表面，避光搅拌反应过夜，即可得到酶标金抗体(HRP-(Au-400P1))。同样通过金抗体抑制溶菌酶活性实验确定每个金抗体上的最佳HRP个数。

1.4 溶菌酶活性检测

HEWL的酶活性是以溶壁微球菌为底物的比浊法来确定，通过使用紫外-可见分光光度计检测在450 nm处的动态吸光度来测定^[16]。底物储备溶液是将溶壁微球菌分散到磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 6.2)中。HEWL储备溶液同样在磷酸盐缓冲液中制备。测定方法是将0.5 ml的HEWL溶液添加到1 ml的Au-P1或HRP-(Au-400P1)溶液中并充分混合1 min。然后将1 ml底物溶液加入到混合物中。剧烈振荡以混匀后，将混合物迅速转移到比色皿中进行吸光度测量。所有样品和测定均在25℃下进行。180 s内吸光度变化与时间的斜率代表HEWL的活性。在抑制剂的作用下，测量斜率与游离HEWL斜率之间的比值表示HEWL的相对活性，相对活性的丢失即为抑制剂对HEWL的相对抑制率。

1.5 酶标金抗体在ELISA中的应用

按照图1c的设计方案，以酶标金抗体进行了溶菌酶的定量检测。参照了标准的ELISA直接法检测步骤，并进行实验条件的优化。实验用96孔板，在Varioskan Flash多功能酶标仪上进行。同时用酶标天然抗体按标准的ELISA直接法检测进行对照。

为检验酶标金抗体ELISA法在复杂溶液条件中检测溶菌酶的效果，本实验采取加标回收的方法，以已知浓度HEWL混合高浓度的杂蛋白作为测试样品。我们选择与HEWL性质相似的带正电的RNase A和血液中大量存在的带负电白蛋白(BSA)作为代表性杂蛋白。先分别配置HEWL、RNase A和BSA纯溶液，并通过测定吸收度确定三者各自的浓度。然后按一定比例混合得到加标样品。最终样品中HEWL的浓度分别为1.5、4.6、10 mg/L，对应的RNase A浓度为HEWL浓度的10倍即15、46、100 mg/L，对应的BSA设置为HEWL浓度的100倍即150、460、1 000 mg/L。将三个样品分别以传统直接法和酶标金抗体直接法来进行加标回收测定，分析测定值及加标回收率。

1.6 检测蛋清中的溶菌酶

为检验酶标金抗体 ELISA 法对于真实样品中检测溶菌酶的效果, 我们对鸡蛋蛋清中溶菌酶进行了检测。将鸡蛋打碎并将蛋液混合物置于烧杯中, 使用注射器人工将蛋清分离出来, 使用 20 mmol/L pH 9.2 碳酸盐缓冲溶液稀释, 最后使用 20 mmol/L pH 10.7 碳酸盐缓冲溶液将稀释液配制为最终的待测样品, 测定蛋清稀释液中的溶菌酶含量, 同时使用传统 ELISA 法直接法对蛋清稀释液进行测定, 分析两种方法的测定值以及蛋清中溶菌酶的总含量。

2 结果与讨论

以粒径约 3.6 nm AuNPs 为骨架的抗溶菌酶金抗体 (附件图 S1~S3) 虽然具有很好的特异性结合溶菌酶的能力, 并得到较为详尽的研究^[16-17]。但可能由于 HRP 标记后, 对 3.6 nm 金抗体有遮蔽金作用, 大大降低金抗体活性 (附件图 S4), 因此本文重点选择粒径较大的 AuNPs (~13 nm, 图 2a, b) 作为骨架。首先通过金抗体抑制溶菌酶活性实验确定 13 nm AuNPs 上最佳 P1 多肽的密度。结果显示, 当平均每个金纳米粒子上连接 450 条 P1 多肽时, 金抗体对 HEWL 酶活性抑制率最高 (图 2c)。考虑到在金抗体表面偶联 HRP 时需要挤占一部分位点, 因此选择平均每个金纳米粒子上连接 400 条 P1 多肽作为最佳偶联密度。

然后在平均每个金纳米粒子上偶联 400 条 P1 多肽基础上, 偶联不同数量的 HRP, 得到 HRP-金抗体偶联物 (图 3a)。同样通过金抗体抑制溶菌酶活性实验来检测偶联 HRP 对金抗体识别溶菌酶的影响。结果显示, 在平均每个金抗体表面偶联 10 个以内的 HRP 后, 金抗体仍然可以较好地抑制溶菌酶的活性 (图 3b)。

下一步, 用制得的不同 HRP 偶联量的酶标金抗体代替天然抗体, 初步探索用 ELISA 法定量测定溶菌酶含量实验。实验结果显示 (图 4), 和预期一样, 金抗体表面偶联 HRP 越多, 检测到的信号越强; 而作为阴性对照的金纳米粒子和没有偶联 HRP 的金抗体则没有检出信号。综上结果, 最终选定 10HRP-(Au-400P1) 为 ELISA 用酶标金抗体。

由于抗原包被的质量对后续 ELISA 检测有重要影响。因此, 对包被 HEWL 的包被缓冲液 pH 进行了优化, 同时对酶底物反应时间进行了优化 (附件图 S10)。优化反应条件后, 将酶标金抗体代替

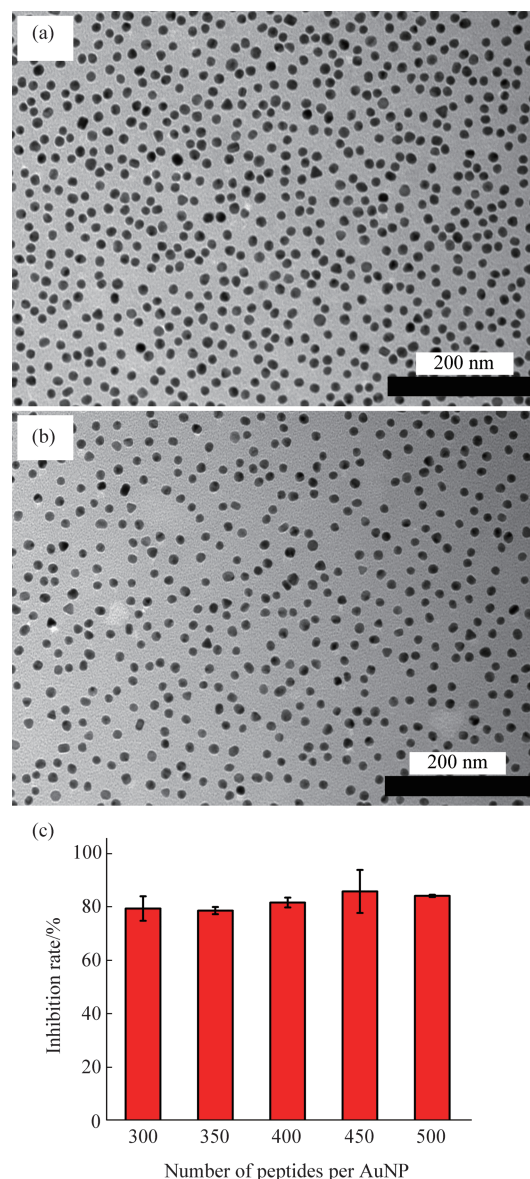


Fig. 2 Characterization of AuNPs and goldbody

(a) TEM image of AuNPs. (b) TEM image of Au-P1. (c) Inhibition of the activity of HEWL by goldbodies with different P1 density. Error bars indicate SDs of triplicate experiments.

检测抗体进行探索, 确定检测步骤如下:

a. 包被。在 96 孔板中, 每孔加入对应 100 μ l 不同浓度 HEWL (20 mmol/L pH 10.7 碳酸盐缓冲溶液), 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 洗板并拍干。

b. 封闭。在包被后的孔板中, 每孔加入 200 μ l 5% BSA (20 mmol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液), 室温下振荡 1 h; 洗板并拍干。

c. 结合酶标金抗体。在对应板孔中加入 100 μ l 酶标金抗体, 室温下振荡反应 2 h; 洗板并拍干。

d. 酶底物反应：加入 100 μl 现配酶底物 (o-phenylenediamine, OPD, pH 5.5 缓冲盐溶液)，避光反应 15 min 后，加入 100 μl 2 mol/L 硫酸终止反应。

e. 检测分析：使用多功能酶标仪测定最终反应结果，并对数据进行分析。

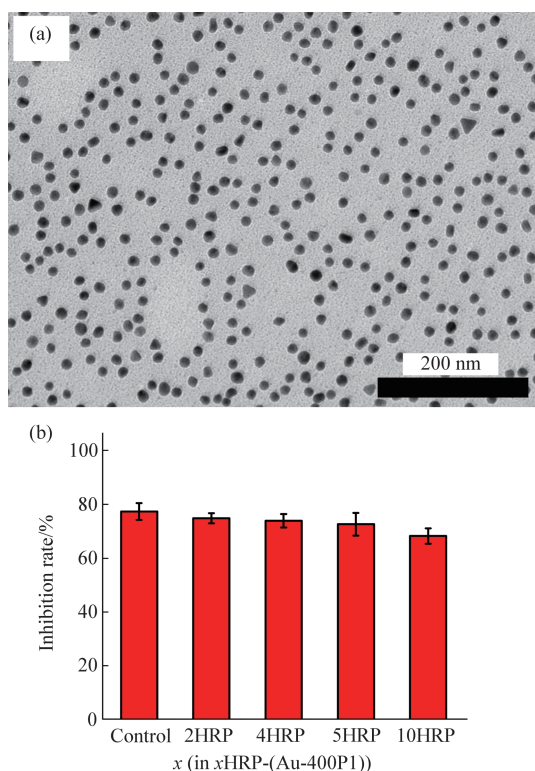


Fig. 3 Characterization of enzyme-labeled goldbody

(a) TEM image of HRP-(Au-400P1). (b) Inhibition of the activity of HEWL by enzyme-labeled goldbodies with different HRP density. Error bars indicate SDs of triplicate experiments.

实现以上条件和步骤优化后，对一系列浓度的标准 HEWL 溶液用 ELISA 法进行定量检测，得到了标准曲线（图 5a），通过对检测曲线进行拟合，最终得到的浓度曲线方程为： $A_{495\text{ nm}} = 3.81 - 3.75 / (1 + (c/3.72)^{2.6})$ ($R^2 = 0.99$)。 $A_{495\text{ nm}}$ 为在 495 nm 处检测的酶解产物吸光度， c 为溶菌酶浓度。从图 5a 可以看出，抗溶菌酶金抗体 ELISA 的定量检测范围为 1~16 mg/L，这与传统 ELISA 方法的检测范围相当^[24]。

为了和传统的直接法 ELISA 比较，以商业试剂盒中的酶标抗溶菌酶天然抗体及配套底物（底物

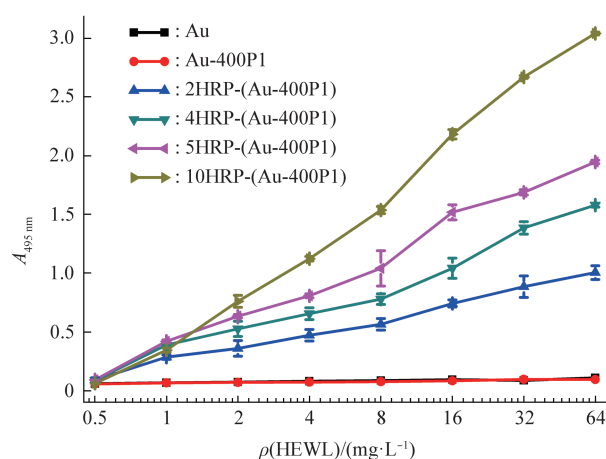


Fig. 4 Signal of enzyme-labeled goldbodies with different HRP density

略有不同，对应检测波长有一定变化）绘制传统的直接法 ELISA 检测溶菌酶曲线（图 5a），拟合得到标准曲线方程为： $A_{450\text{ nm}} = 0.87 - 0.82 / (1 + (c/18.28)^{1.38})$ ($R^2 = 0.99$)。通过对比可以看出，金抗体和天然抗体检测范围大致相当，但在检测低浓度溶菌酶时，金抗体 ELISA 法比传统的直接法 ELISA 更灵敏。

为进一步确定抗溶菌酶金抗体 ELISA 检测 HEWL 的特异性，以和溶菌酶大小带电等性质都十分相似的 RNase A 来测试该方法的实用性。从图 5b 可以看出，和溶菌酶同浓度的纯 RNase A 几乎不产生检测信号，而即使用 HEWL 5 倍浓度的 RNase A 和 HEWL 相混合作为待测样品，检测信号也和同溶菌酶浓度的纯 HEWL 检测信号几乎完全一致，从而验证了酶标金抗体对较为复杂环境中抗原的检测能力。

然后，采取加标回收的方法检验酶标金抗体 ELISA 法在复杂溶液条件中检测溶菌酶的效果。表 1 列出了分别用金抗体 ELISA 法和天然抗体 ELISA 直接法检测参杂高浓度 RNase A 和 BSA 的 HEWL 样品的检测结果。从结果可以看出，酶标金抗体检测的 3 个样品，其回收率均在 90%~110% 以内，符合检测标准。而且无论是检测值的平均偏差还是样品加标回收率，金抗体 ELISA 法（检测值的平均偏差 ± 0.04 ，回收率平均偏差为 +2.3%）都优于天然抗体 ELISA 直接法（检测值的平均偏差 ± 0.17 ，回收率平均偏差为 -9.4%），因而金抗体 ELISA 法检测准确度比传统的 ELISA 直接法更高。

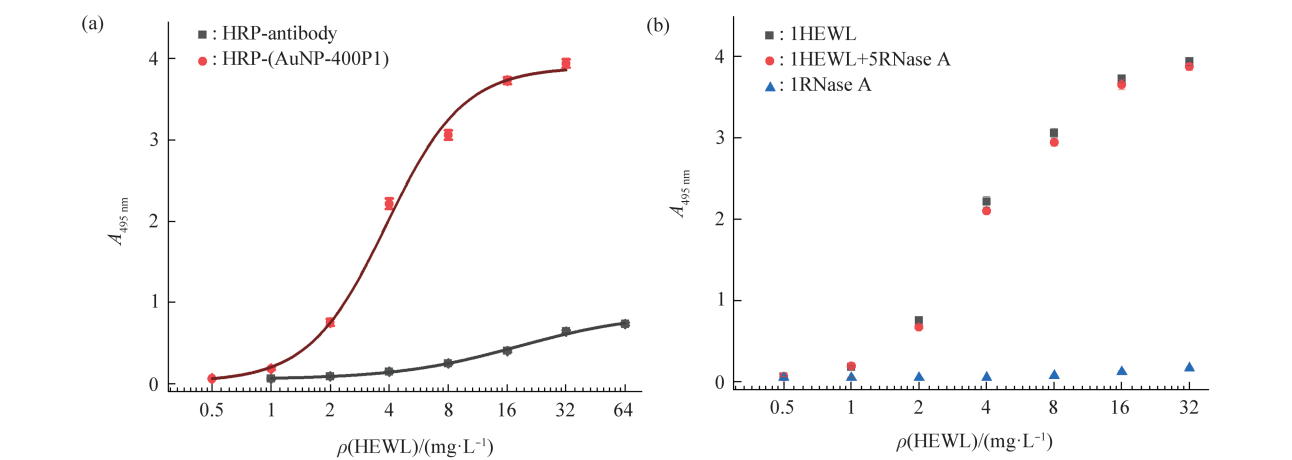


Fig. 5 Detection of HEWL by ELISA with goldbody (10HRP-(Au-400P1)) or natural antibody
(a) Detection of different concentration of HEWL by ELISA with HRP-(Au-400P1) or HRP-antibody. (b) Detection of HEWL by ELISA with 10HRP-(Au-400P1) in the absence or presence of RNase A. Error bars indicate SDs of triplicate experiments.

Table 1 Recovery of spiked HEWL samples by goldbody-ELISA and traditional direct ELISA						
$\rho(\text{HEWL})/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Traditional direct ELISA			Goldbody-ELISA		
	Measured concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	CV/%	Measured concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	CV/%
1.5	1.29±0.10	86.1	7.39	1.60±0.01	106.7	0.66
4.6	4.21±0.09	91.5	2.20	4.74±0.05	103.0	1.07
10	9.42±0.31	94.2	3.29	9.72±0.06	97.2	0.64

最后,对真实样品即鸡蛋蛋清中的溶菌酶含量进行检测,以检验酶标金抗体ELISA法对于实际样品的检测效果。先用两个不同的稀释倍数将蛋清稀释至ELISA法的检测范围,以验证检测方法的可靠性和实用性(表2)。从表2中可以看出,酶标

金抗体ELISA法对不同稀释倍数的样品检测结果一致性要优于传统ELISA直接法检测结果。同时,检测所得的蛋清中溶菌酶含量与相关文献报道相近^[25]。

Table 2 Detection of lysozyme in egg white by goldbody-ELISA and traditional direct ELISA						
Dilution factor	Traditional direct ELISA			Goldbody-ELISA		
	Measured concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Converted concentration for egg white/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	CV/%	Measured concentration/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Converted concentration for egg white/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	CV/%
500	4.92±0.15	2.46±0.07	3.01	5.41±0.07	2.71±0.04	1.35
1 000	2.53±0.03	2.53±0.03	1.14	2.73±0.07	2.73±0.07	2.47

3 结 论

在前期工作基础上,本文首先以13 nm AuNPs为骨架合成和优化了抗溶菌酶金抗体,并制备了可以用于ELISA检测的酶标抗溶菌酶金抗体10HRP-(Au-400P1),可用于定量检测1~16 mg/L范围内的HEWL,检测范围和传统的ELISA方法相当。金抗

体ELISA展示了良好的特异性,实验结果表明,即使和高浓度的、与HEWL性质极为相似的RNase A混合,也不影响对HEWL的检测结果。加标回收法对比测试结果显示,无论是测量值的平行性还是加标样品的回收率,酶标金抗体ELISA法都明显优于传统的天然抗体ELISA直接法。当然,金抗体ELISA还有很大的优化提升空间,比如选

择更合适的金纳米粒子尺寸, 以及增加HRP的耦联量。相信经过进一步优化后, 可以用于检测更低的抗原浓度。以金抗体代替天然抗体用于ELISA直接法检测, 不仅避免了天然抗体稳定性差的缺点, 而且10HRP-(Au-400P1)作为检测抗体, 还具备了部分间接法的优势, 即HRP-PEG大致相当于间接法中的酶标二抗, 且价格低于酶标二抗, 既降低了生产成本, 也避免了交叉反应。随着未来更多识别不同抗原金抗体的开发, 相信可以广泛地使用金抗体代替天然抗体用于ELISA法检测和诊断。

附件 PIBB20210293_Figure_S1.pdf见本文网络版(<http://www.pibb.ac.cn>或<http://www.cnki.net>)。

参 考 文 献

- [1] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, **8**(9): 871-874
- [2] 胡昌勤. 酶联免疫吸附法的新进展. *生物化学与生物物理进展*, 1993, **20**(2): 85-89
Hu C Q. *Prog Biochem Biophys*, 1993, **20**(2): 85-89
- [3] Engvall E. Citation classic the ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem*, 2010, **56**(2): 319-320
- [4] Danielak D, Banach G, Walaszczyk J, *et al.* A novel open source tool for ELISA result analysis. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **189**: 113415
- [5] Tighe P J, Ryder R R, Todd I, *et al.* ELISA in the multiplex era: potentials and pitfalls. *Proteom Clin Appl*, 2015, **9**(3-4): 406-422
- [6] Slieman T A, Leheste J. Introduction to immunological techniques in the clinical laboratory. *Methods Microbiol*, 2020, **47**: 1-16
- [7] Li N, Wang P T, Wang X Y, *et al.* Molecular diagnosis of COVID-19: current situation and trend in China (Review). *Exp Ther Med*, 2020, **20**(5): 13
- [8] Zheng W S, Jiang X Y. Integration of nanomaterials for colorimetric immunoassays with improved performance: a functional perspective. *Analyst*, 2016, **141**(4): 1196-1208
- [9] Wu L, Li G H, Xu X, *et al.* Application of Nano-ELISA in food analysis: Recent advances and challenges. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, **113**: 140-156
- [10] Esen C, Czulak J, Cowen T, *et al.* Highly efficient abiotic assay formats for methyl parathion: molecularly imprinted polymer nanoparticle assay as an alternative to enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal Chem*, 2019, **91**(1): 958-964
- [11] Zhao Q, Lu D, Zhang G Y, *et al.* Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials. *Talanta*, 2021, **223**: 121722
- [12] Lequin R M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 2006, **51**(12): 2415-2418
- [13] Wang Z D, Fang X W, Sun N R, *et al.* A rational route to hybrid aptamer-molecularly imprinted magnetic nanoprobe for recognition of protein biomarkers in human serum. *Anal Chim Acta*, 2020, **1128**: 1-10
- [14] Pina D G, Shnyrova A V, Gavilanes F, *et al.* Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *Eur J Biochem*, 2010, **268**(1): 120-126
- [15] Kishore D, Kundu S, Kayastha A M. Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric β -galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PLoS One*, 2012, **7**(11): 550380
- [16] Yan G H, Wang K, Shao Z X, *et al.* Artificial antibody created by conformational reconstruction of the complementary-determining region on gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, **115**(1): E34-E43
- [17] Luo L, Liu Y Y, Gao T G, *et al.* Characterization of the specific interactions between nanoparticles and proteins at residue-resolution by alanine scanning mutagenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, **12**(31): 34514-34523
- [18] 曹傲能. 蛋白质结构的"限域下最低能量结构片段"假说与蛋白质进化的"石器时代". *物理化学学报*, 2020, **36**(1): 1907002
Cao A N. *Acta Phys-Chim Sin*, 2020, **36**(1): 1907002
- [19] Cao A N. The last secret of protein folding: the real relationship between long-range interactions and local structures. *Protein J*, 2020, **39**(5): 422-433
- [20] Willson R. F1000Prime Recommendation of [Yan G H, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 115, E34 – E43 (2018)]. London: Faculty Opinions, 2018. [https://dx. doi. org/10.3410/f.732327157.793541057](https://dx.doi.org/10.3410/f.732327157.793541057)
- [21] Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Brit J Hosp Med*, 2016, **77**(7): C98-C101
- [22] Gao Y, Zhou Y, Chandrawati R. Metal and metal oxide nanoparticles to enhance the performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *ACS Appl Nano Mater*, 2020, **3**(1): 1-21
- [23] Dong J, Ueda H. ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods. *Wires Nanomed Nanobi*, 2017, **9**(5): e1457
- [24] Montoya-Estrada C N, Silva P F, Costa C R, *et al.* An agglutination test for fast and specific detection of *Erwinia psidii*. *Forest Pathol*, 2019, **49**(5): e12549
- [25] Cai Z X, Chen G X, Huang X, *et al.* Determination of lysozyme at the nanogram level in chicken egg white using Resonance Rayleigh-scattering method with Cd-doped ZnSe quantum dots as probe. *Sensor Actuat B-Chem*, 2011, **157**(2): 368-373

Goldbody as a Replacement of Natural Antibody in Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of Lysozyme*

XU Yan-Jiao**, LI Wen-Hao**, GAO Tian-Ge, CAO Ao-Neng***

(Institute of Nanochemistry and Nanobiology, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract Objective Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) has been widely used for detection of antibodies or antigens, and is regarded as the gold standard in clinical diagnosis, which can provide relatively reliable, sensitive and specific results. The essence of ELISA is the specific interaction between antigens and the corresponding antibodies. However, the inherent instability of natural antibodies is the Achilles heel of ELISA, which may lead to poor reproducibility or even false results. Previously, our group created a nova gold nanoparticle-based artificial antibody, denoted as goldbody. Goldbody can specifically interact with antigens like natural antibodies, but has much better stability than that of natural antibodies. The excellent stability of goldbody makes it a potential replacement of natural antibodies in ELISA assays. **Methods** Herein, we demonstrate with a series of experiments that goldbody is indeed a good replacement of natural antibodies in ELISA for antigen detection. **Results** After necessary optimization and conjugation of horseradish peroxidase (HRP), the 13 nm HRP-labeled anti-hen egg white lysozyme (HEWL) goldbody can be used in ELISA assay to detect HEWL in the range of 1–16 mg/L. **Conclusion** Goldbodies can indeed replace natural antibodies in ELISA for a more accurate and consistent detection of antigens.

Key words goldbody, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), conformational engineering, antibody, lysozyme

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0293

* This work was supported by The National Natural Science Foundation of China (31871007, 22071145) and the National Key Research and Development Plan of China (2016YFA0201602).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-21-66135277-102, E-mail: ancao@shu.edu.cn

Received: September 28, 2021 Accepted: November 29, 2021