

噬菌体展示技术在毒素检测分析中的应用

胡晓飞¹, 栗 力², 邢广旭¹, 裴亚峰¹, 职爱民¹, 王 耀¹,
孙亚宁¹, 王 磊¹, 赵丽娜¹, 邓瑞广¹

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点实验室/ 河南省动物免疫学重点实验室,
河南 郑州 450002; 2. 河南省农村能源环境保护总站, 河南 郑州 450002)

摘要: 霉菌毒素严重危害动物及人类健康, 毒素检测已成为评价农产品、食品、饲料品质的重要内容之一。毒素检测有一定危险性, 建立新的毒素检测手段意义重大。噬菌体展示技术是一种设计精巧、具有极强分离多肽功能的生物学技术。综述了此项技术的发展和在筛选霉菌毒素模拟表位肽中的作用及模拟表位肽在毒素检测中的应用, 并展望了该技术的应用前景。

关键词: 霉菌毒素; 检测; 噬菌体展示技术; 模拟表位肽

中图分类号: S859.84 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)06-0032-04

The Usage of Phage Display Technique in Mycotoxins Detection

HU Xiao-fei¹, LI Li², XING Guang-xu¹, PEI Ya-feng¹, ZHI Ai-min¹, WANG Yao¹,
SUN Ya-ning¹, WANG Lei¹, ZHAO Li-na¹, DENG Rui-guang¹

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of Ministry of Agriculture/ Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. General Station of Henan Rural Energy and Environmental Protection, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Mycotoxins are seriously harmful to animal and human kinds, which have been one of the key indexes of quality monitor of food, agricultural commodities, feedstuffs. It is peril for checker in the detection of mycotoxins, and it is necessary to develop a new method for mycotoxins determination safely. Phage display is an exquisite biotechnology, which has a great capacity for segregating peptide. The development and function in screening mimicking epitope of mycotoxins of phage display and the usage of mimicking epitope in mycotoxins detection were reviewed, and the future of the mimicking epitope was looked into.

Key words: Mycotoxins; Detection; Phage display technique; Mimicking epitope

霉菌毒素(mycotoxin)是真菌的次生代谢产物, 约300多种, 通过污染农作物产品(如谷物、油料作物的籽实、坚果、咖啡等)、水果及果汁、饮料(包括白酒和啤酒)、调味品及动物产品(肉、蛋、奶)而存在于食物链各个环节^[1-3]。霉菌毒素污染食品及饲料的现象在全世界范围内普遍存在, 严重威胁人类及动物的健康和生命安全, 因此, 毒素检测技术显得尤为重要。其中, 噬菌体展示技术是一种具有极强分离多

肽功能的生物学技术。现对其在筛选霉菌毒素模拟表位肽中的作用及其在毒素检测中的应用综述如下。

1 霉变的危害

霉变造成饲料、粮食及食品大量浪费。霉菌使脂质发生变化, 如玉米中脂肪可分为游离脂质和与其他成分结合的脂类化合物, 游离脂质随霉菌的繁殖而明显减少, 而脂类化合物增加, 从而降低玉米的

可利用能量。霉菌降低了粮食中蛋白质含量,减小蛋白质的溶解度,纯蛋白质含量减少,铵态氮含量增加,造成代谢能减少。此外,霉菌还可降低蛋白质的可消化性,使维生素破坏、减少等。我国2004年因霉菌污染造成养殖业的损失高达150亿元。2004年,河南省由于玉米霉变引起猪只死亡的损失达10亿元左右。2002年,美国食品、谷物及饲料因霉菌毒素污染造成的直接经济损失高达14.4亿美元^[4]。

霉变后的谷物饲料和食品因霉菌产生的毒性代谢物而严重威胁动物及人类的健康。霉菌毒素对人及动物有极强的危害作用:降低人及动物的免疫机能;减少动物采食量、日增体质量及饲料效率;损害人及动物的神经系统及生殖系统,造成各种实质性组织器官的病变坏死及损伤;降低机体造血功能,引起人及动物贫血;引起“三致”(致癌、致畸、致突变)作用。尽管不同种类霉菌毒素的主要危害不尽相同,但最终结果是损害人体健康,引起人类疾病,甚至死亡;增加动物死淘率,降低动物生产性能,从而降低养殖效益。霉菌检测已成为评价食品谷物饲料品质的重要内容之一。目前,危害比较大的霉菌毒素有黄曲霉毒素(aflatoxins)、单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)、玉米赤霉烯酮(zearalenone)、赭曲霉毒素A(ochratoxin A)、烟曲霉毒素(fumonisin)和麦角类生物碱(ergot alkaloids)等^[4]。

2 霉菌毒素的检测方法

霉菌毒素检测方法较多,其中色谱法和质谱法是最常用的霉菌毒素分析方法,并由此衍生出一系列的毒素分析方法^[5-8]。虽然色谱及质谱法测定结果准确可靠,但需要专业操作人员及大型仪器设备,测定过程繁琐、耗时长,不符合食品、饲料等现场快速测定的要求,因此很难进行大范围推广使用。

近红外光谱技术(near infrared, NIR)是一种高效快速的现代分析技术,它综合运用了计算机技术、光谱技术和化学计量等多个学科的最新研究成果,以其快速高效的独特优势在多个领域得到应用,20世纪90年代末被引入到霉菌毒素检测中^[9-10]。但此方法需要对原始的光谱进行预处理,需要建立校正模型,熟练掌握该技术需要一定的时间,而且由于需要计算机及光谱设备,因此无法应用于现场检测。昂贵的仪器价格也限制了该技术的普及应用。

根据抗原抗体特异性结合的免疫学原理建立的霉菌毒素检测方法特异性强,灵敏度高,检测限低,而且比较简单方便,比理化测定方法缩短了检测时间^[11]。尤其是20世纪70年代,胶体金被引入到免

疫标记技术中,其与固相膜结合推动了以膜为固相载体的免疫胶体金快速诊断技术的出现,由于其特异、灵敏、快速、方便、无需特殊设备及试剂、结果判断直观等优点,在医学临床检验、药残检测及霉菌毒素检测方面得到广泛应用^[12-14]。霉菌毒素检测胶体金试纸条简化了毒素检测步骤,缩短检测时间,一般5~10 min即可给出准确可靠的结果,大大缩短了检测过程,使即时检测成为可能,已经在畜牧兽医及食品安全检测领域普及应用。

尽管免疫学方法测定霉菌毒素具有很多的优点,但由于其原理是毒素竞争性抗原抗体反应,因此需要使用毒素标准品,在试验操作过程中,存在毒素损害检测人员健康的可能性,而且试验中的毒素残留还可能造成环境污染。因此,寻求一种与毒素具有相同免疫原性的无毒产品,替代毒素检测中的毒素标准品,提高毒素检测时的安全性成为当务之急。噬菌体展示技术的出现,为此提供了可能性。

3 噬菌体展示技术简介

噬菌体展示技术(phage display techniques, PDT)是一种设计精巧,具有极强分离多肽功能的生物学技术,它把基因表达产物与亲和筛选结合起来,从展示在噬菌体粒子表面及其庞杂的蛋白质中筛选出具有特定特征及功能的目的多肽或蛋白质。1982年,Dulbecco^[15]首次提出在噬菌体或其他病毒表面展示外源抗原决定簇或多肽的概念。之后,研究人员成功地把外源抗原决定簇与噬菌体外壳蛋白融合,所表达的多肽或蛋白质以融合蛋白形式展现在噬菌体外表面上^[16]。

PDT的基本原理是以改构的噬菌体为载体,在其外壳蛋白基因中定向插入待选基因片段,使基因表达产物展示在噬菌体表面,通过亲和富集法筛选带有特异肽或蛋白质的噬菌体。该技术的核心是将蛋白质分子表型和基因型结合于噬菌体载体上,通过一系列生物化学及遗传学操作,简化蛋白质分子表达库的筛选与鉴定。研究证明,该技术在科学研究和工业生产中均是一种多功能的工具,从探索蛋白分子干扰表面的特性到分离制药工业中的治疗蛋白,从抗原表位筛选到免疫诊断、药物筛选、疫苗研制等方面均有广泛的应用^[17]。

噬菌体展示肽库是噬菌体展示技术发展的重要成果之一,它是由大量携带不同肽段的单一噬菌体所组成的重组噬菌体库。噬菌体展示肽库技术也是噬菌体展示技术的重要分支之一。虽然各重组噬菌体采用的技术路线不同,但其原理基本上是一致的,

都是先在体外随机合成编码短肽的 DNA 片段,再经 PCR 扩增或杂交形成携带适当酶切位点的克隆片段,然后与噬菌体外壳蛋白(PV II或P III)基因下游区融合表达而被组装展示于噬菌体颗粒的表面,从而组成每个噬菌体都带有一个不同肽段的重组噬菌体库^[18]。然后再应用免疫亲和层析的方法,根据不同分子间(如酶-底物、抗原-抗体、受体-配体)亲和力强弱的差异,用目标蛋白来筛选与之相互作用的噬菌体肽,通过直接或多轮(一般3~5轮即可)筛选,挑选出带有目的基因的重组噬菌体^[19],通过不同分离手段得到目的蛋白或多肽。通过分析所筛选的噬菌体肽氨基酸序列及结构,来揭示蛋白质分子间相互作用机制。鉴于噬菌体展示肽库无与伦比的优越性,它在免疫学、细胞生物学、药物开发及霉菌毒素检测等领域越来越受到重视。

4 噬菌体展示技术在毒素检测中的应用

噬菌体展示技术的出现,为寻求霉菌毒素替代品,提高毒素检测的安全性开辟了一条新思路。目前,通过噬菌体展示技术在噬菌体肽库中寻求各种霉菌毒素的模拟表位肽成为一个研究热点。国内外先后成功地用噬菌体展示技术得到了一些霉菌毒素的模拟表位肽。1999年,Yuan等^[20]利用制备的呕吐毒素(脱氧雪腐镰刀菌烯醇,DON)的单克隆抗体从噬菌体展示七肽库中随机挑选2个噬菌体克隆,编码的氨基酸序列分别为SWGPFPF和SWG-PLPF,命名为DONPEP.2和DONPEP.12,竞争ELISA试验结果表明,这2段呕吐毒素模拟表位肽都能有效地抑制DON与DON特异性抗体的结合。2001年,Thirumala-Devi等^[21]通过噬菌体随机七肽库淘选,第一次得到黄曲霉毒素B1的模拟表位肽。邓省亮等^[22]利用随机七肽库通过4轮筛选得到4个能抑制黄曲霉毒素B1的阳性克隆子,利用其中1个阳性克隆建立竞争ELISA检测方法,线性范围为0.5~2mg/L。Liu等^[23]利用随机七肽库经过4轮筛选得到11个表达赭曲霉毒素A模拟表位肽的噬菌体阳性克隆,其共有的氨基酸序列为IRPMVXX(X为任意氨基酸),利用筛选到的模拟表位肽建立的竞争ELISA检测方法,线性范围为0.2~8mg/L,说明此模拟表位肽对赭曲霉毒素A单克隆抗体的特异性及敏感性比较强,可以用来替代赭曲霉毒素A用于检测过程。何庆华等^[24]利用噬菌体七肽库,经过3轮筛选得到9个玉米赤霉烯酮(ZEN)的噬菌体阳性克隆,竞争ELISA试验结果表明,9个阳性

克隆均能被ZEN毒素抑制,检测线性范围为0.1~10mg/L。上述几种毒素模拟表位肽的取得,为赭曲霉毒素的安全、快速检测奠定了坚实的基础。

5 展望

霉菌毒素毒性很强,均可引起致癌、致畸、致突变“三致”现象的发生。以黄曲霉毒素为例,1993年,黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为一类致癌物,是目前发现的最强的致癌物质。其致癌力是奶油黄的900倍,比二甲基亚硝胺诱发肝癌的能力大75倍,比3,4-苯并芘大4000倍。它主要诱使动物发生肝癌,也能诱发胃癌、肾癌、直肠癌及乳腺、卵巢、小肠等部位的癌症。同时它也是一种剧毒物质,其毒性远远高于氰化物、砷化物和有机农药,比氰化钾大100倍,比砒霜大68倍。因此,建立安全的毒素检测方法,减少检测人员对毒素的接触意义重大。赖卫华等^[25]把筛选的赭曲霉毒素A模拟表位肽应用到赭曲霉毒素A无毒体系胶体金试纸条研制中,所制备的胶体金试纸条和传统的胶体金试纸条相比,检测灵敏度及检测时间均无差异,完全适合用于赭曲霉毒素A现场检测。通过淘选霉菌毒素模拟表位肽,用这些模拟表位肽替代检测中的毒素标品,不但增加了检测人员的操作安全,同时也减少了霉菌毒素可能对环境造成的污染。因此,把免疫胶体金标记技术与噬菌体展示技术相结合用于霉菌毒素的检测,将是一种必然趋势。同时,噬菌体展示技术在霉菌毒素检测中的应用也给人们指明了一个方向,即在检测各种病毒、农药及毒素等危害人体健康并可能造成环境污染的产品时,可以利用噬菌体展示技术淘选各种病毒、农药及毒素的模拟表位肽,结合免疫学技术、胶体金标记技术、荧光量子点技术,建立各种快速、灵敏、特异、便捷的检测方法,保证各种有毒有害物质检测时的人身安全和环境安全。

参考文献:

- [1] Chiodini A M, Scherpenisse P, Bergwerff A A. Ochratoxin A contents in wine: comparison of organically and conventionally produced products [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(19): 7399-7404.
- [2] Harcz P, Tangni E K, Wilmart O, et al. Intake of ochratoxin A and deoxynivalenol through beer consumption in Belgium [J]. Food Addit Contam, 2007, 24(8): 910-916.
- [3] Karbancioglu Guler F, Heperkan D. Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs [J]. Anal Chim Acta,

- 2008, 617(1/2): 32-36.
- [4] 计成. 霉菌毒素与饲料食品安全[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [5] Munimbazi C, Bullerman L B. Chromatographic method for the determination of the mycotoxin moniliformin in corn[J]. *Methods Mol Biol*, 2001, 157: 131-145.
- [6] Sforza S, Dallast A C, Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/ mass spectrometry [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2006, 25(1): 54-76.
- [7] Beltrán E, Ibanez M, Sancho J V, *et al.* Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(12): 1801-1809.
- [8] Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, *et al.* Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(5): 1355-1372.
- [9] Yi Y Y, Li D R, Zhang W, *et al.* Applications of near infrared reflectance spectroscopy in detecting chitin, ergosterol and mycotoxins [J]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 2009, 29(7): 1826-1829.
- [10] Xu Q F, Han J G, Yu Z, *et al.* Applications of near infrared reflectance spectroscopy technique to determination of forage mycotoxins [J]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi*, 2010, 30(5): 1243-1247.
- [11] Shephard G S. Determination of mycotoxins in human foods [J]. *Chem Soc Rev*, 2008, 37(11): 2468-2477.
- [12] Heckel K, Kiefmann R, Dorger M, *et al.* Colloidal gold particles as a new *in vivo* marker of early acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(4): 867-878.
- [13] Chen Y, Wang Z, Wang Z, *et al.* Rapid enzyme linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for kanamycin and tobramycin in swine tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(9): 2944-2952.
- [14] Zhao Y, Zhang G, Liu Q, *et al.* Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(24): 12138-12142.
- [15] Dulbecco R. Immunological markers in the study of development and oncogenesis in the rat mammary gland [J]. *J Cell Physiol (Suppl)*, 1982, 2: 19-22.
- [16] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228: 1315-1317.
- [17] Paschke M. Phage display systems and their applications [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(1): 2-11.
- [18] Cesareni G, Castagnoli L, Cestra G. Phage displayed peptide libraries [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 1999, 2(1): 1-17.
- [19] Nishibori N, Horiuchi H, Furusawa S, *et al.* Humanization of chicken monoclonal antibody using phage-display system [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(6): 634-642.
- [20] Yuan Q, Pestka J J, Hespeneide B M, *et al.* Identification of mimotope peptides which bind to the mycotoxin deoxynivalenol-specific monoclonal antibody [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(8): 3279-3286.
- [21] Thirumala Devi K, Miller J S, Reddy G, *et al.* Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 in serological reactivity [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90(3): 330-336.
- [22] 邓省亮, 许杨, 刘仁荣. 采用噬菌体展示技术筛选黄曲霉毒素 B1 模拟抗原表位 [J]. *卫生研究*, 2007, 36(1): 59-63.
- [23] Liu R R, Yu Z, He Q H, *et al.* Study on screening mimicking epitope of ochratoxin A from phage display peptide library [J]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2005, 34(4): 448-450.
- [24] 何庆华, 刘仁荣, 许杨. 利用噬菌体肽库淘选玉米赤霉烯酮的模拟表位 [J]. *食品科学*, 2007, 28(8): 241-243.
- [25] 赖卫华, 许杨, 熊勇华, 等. 赭曲霉毒素 A 无毒体系胶体金试纸条的研制及与传统胶体金试纸条的比较 [J]. *食品科学*, 2008, 29(9): 465-468.