

## 新型纳米材料与噬菌体展示技术在真菌毒素检测中的应用

冯林,陈雪岚\*

(江西师范大学 生命科学院,江西 南昌,330022)

**摘要** 真菌毒素是真菌在生长繁殖过程中产生的次级有毒代谢产物,具有致癌、致畸、致突变的毒性作用,严重危害人体健康,因此对其检测与控制非常重要。现有检测方法普遍存在样品预处理复杂、成本高、操作繁琐等缺点,且会对操作人员和环境造成潜在二次危害。新型纳米材料可以提高真菌毒素的检测灵敏度,噬菌体展示技术可以筛选真菌毒素的模拟表位和抗真菌毒素的重组抗体,降低检测成本,达到无毒检测真菌毒素的目的。文章综述了近年来不同种类的纳米材料与噬菌体展示技术以及两者相互结合在真菌毒素检测方面的应用,并对其未来的发展进行了展望。

**关键词** 真菌毒素;新型纳米材料;噬菌体展示技术;无毒检测;灵敏度;模拟表位

真菌毒素(mycotoxins)是真菌在生长繁殖过程中产生的次级有毒代谢产物。据联合国粮农组织统计,每年全世界范围内大约有25%的农产品受到真菌毒素的污染,已经成为全球性的公共卫生健康问题<sup>[1]</sup>。截止目前,已发现400多种化学结构各异的真菌毒素<sup>[2]</sup>,主要包括黄曲霉毒素(aflatoxins, AF)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、伏马毒素(fumonisin, FB)、赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)等<sup>[3]</sup>。大多数真菌毒素可通过抑制动物体内蛋白质和相关酶的合成,破坏细胞结构,损害动物体肝脏、肾脏、神经、造血、皮肤等组织器官,具有致癌、致畸、致突变、生殖紊乱以及免疫抑制作用<sup>[4-7]</sup>。真菌毒素分布广泛、分子量小、结构以及化学性质一般均较稳定,即使高温烹任也无法使其分解<sup>[8-9]</sup>,粮食、饲料以及农产品被真菌毒素污染后,通过食物链进入人体体内,严重威胁人类健康。目前,常见的真菌毒素的检测方法主要有生物鉴定法、化学分析法(薄层色谱法)、仪器分析法(高效液相色谱法、气相色谱法、气相色谱质谱联用法、液相色谱串联质谱法、毛细管电泳法)、免疫分析法(酶联免疫吸附法、放射免疫法、亲和层析法、胶体金免疫层析法)等,以上方法各有优缺点。随着纳米技术的发展及其材料在食品安全检测中的应用,以及应用噬菌体展示技术筛选仿真真菌毒素方法的成熟,科研工作者

开发了系列快速、简便、绿色、经济、灵敏度高、特异性强、稳定性好、操作简单的真菌毒素检测方法。本文综述了近年来纳米材料及噬菌体展示技术在真菌毒素检测中的应用,以期为科研工作者进一步研究真菌毒素检测方法提供参考。

### 1 新型纳米材料

纳米材料通常指三维空间中至少有一维横向尺寸达1~100 nm的单质、化合物、混合物<sup>[10]</sup>,具有小尺寸效应、表面效应、宏观量子隧道效应、极高的反应活性、非凡的电子转移能力和高比表面积等物化特性<sup>[11-12]</sup>,因而具有独特的理化性质和尺寸依赖特性,并表现出一系列独特的光学、电学、磁力学及化学催化性能<sup>[13-14]</sup>,被广泛用作识别元件的载体和放大检测信号的探针<sup>[15-16]</sup>。且纳米技术为新型纳米比色传感器的发展提供了广阔的空间<sup>[17]</sup>,已成功用于多种真菌毒素的检测<sup>[18-19]</sup>。新型纳米材料主要包括金属材料、碳纳米材料、磁性纳米材料、量子点、上转换荧光纳米颗粒等。

#### 1.1 金属纳米材料

金属纳米材料包括金属氧化物和贵金属。贵金属纳米材料是纳米材料的一个重要组成部分,在对纳米材料的研究热潮中,因其具有传导性、大的比表面积、局域表面等离子体共振、较高的摩尔消光系数,优

第一作者:硕士研究生(陈雪岚教授为通讯作者, E-mail: xuelanchen162@163.com)

基金项目:国家自然科学基金项目(31960014);国家自然科学基金项目(31660019)

收稿日期:2020-06-22, 改回日期:2020-09-01

良的光、电、磁、催化性能以及良好的生物相容性和易于进行表面修饰等特点而成为应用最为广泛的纳米材料<sup>[20]</sup>。金属纳米材料在真菌毒素检测中主要发挥4种作用:生物分子的固定化、信号的产生、荧光猝灭和信号的放大。URUSOV等<sup>[21]</sup>用金纳米颗粒标记AFB<sub>1</sub>的二抗,采用间接竞争法在胶体金免疫层析试纸条上实现了对AFB<sub>1</sub>的高灵敏检测,该方法能够精确地调整特定抗体和胶体金标记所需的数量,肉眼检测限(limit of detection, LOD)为160 pg/mL,仪器检测限为30 pg/mL。与纯的金属纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)相比,双金属复合物如Ag@Au、Pt@Au、Cu@Au等极大地提高了检测的灵敏度,重现性和稳定性也得到了提高。HE等<sup>[22]</sup>用水热法合成了直径约350 nm的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米颗粒,在机械搅拌下,带有氨基的亲水性聚醚酰亚胺(polyetherimide, PEI)自组装在Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>纳米粒子表面,形成高度分散的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI纳米粒子。而后制备的带负电荷的Au种子通过静电相互作用均匀附着在带正电荷的Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEI表面,并在还原剂的作用下,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au种子成为包覆Au壳的成核位点,制备了Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NFs;再在其上修饰SH-Apt作为捕获探针,建立了一种用于检测花生油中AFB<sub>1</sub>的超灵敏表面增强拉曼光谱传感器。由于AFB<sub>1</sub>适配体及其互补链(SH-cDNA)的识别,报告探针产生了强烈的表面增强拉曼散射(surface-enhanced raman scattering, SERS)信号,而在AFB<sub>1</sub>存在条件下,AFB<sub>1</sub>适配体优先与AFB<sub>1</sub>结合,报告探针从捕获探针上释放,导致SERS强度线性下降,该SERS传感器的LOD为0.40 pg/mL,在0.000 1~100 ng/mL范围内具有较高的灵敏度。

ZHANG等<sup>[23]</sup>以钴离子为节点,铁卟啉为连接剂成功合成了PCN-223-Fe,并原位负载PtAg双金属纳米颗粒,得到了AgPt/PCN-223-Fe复合材料,由于PCN-223-Fe与AgPt的协同作用,AgPt/PCN-223-Fe修饰电极对氧还原具有良好的电催化活性。利用链霉亲和素(SA)对AgPt/PCN-223-Fe进行功能化得到了SA/AgPt/PCN-223-Fe纳米探针,通过生物素和链霉亲和素的识别作用,将SA/AgPt/PCN-223-Fe引入电极表面捕获OTA适配体,产生强烈的氧还原电化学信号。当OTA存在于溶液中时,适配体优先与OTA结合,电化学信号降低。所设计的OTA传感器的LOD为14 fg/mL,检测范围为20~2 ng/mL,成功应用于红酒和玉米样品中OTA的检测。传统的基于20~30 nm金纳米粒子信号强度不足导致灵敏度较

低,只能提供定性或半定量结果,不能同时进行多次检测。此外,用肉眼对试条上的条带进行视觉观察很容易出现人为错误<sup>[24]</sup>。但金属纳米粒子通过与碳纳米材料、磁性纳米粒子、量子点、上转换荧光纳米材料等形成复合材料以及双金属纳米材料复合物可显著提高检测灵敏度,实现高灵敏度定量检测真菌毒素。

## 1.2 碳纳米材料

碳纳米材料,包括碳纳米管(单臂碳纳米管和多臂碳纳米管)、碳纳米纤维、富勒烯、石墨烯量子点和石墨烯等,因其水溶性好、毒性低和可调的荧光发射特性而受到广泛关注<sup>[25]</sup>。LIU等<sup>[26]</sup>采用聚乙烯亚胺功能化的多壁碳纳米管对玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)进行修饰,并在其上沉积金和铂纳米颗粒(AuPt-NPs),利用葡萄球菌A蛋白(staphylococcal protein A, SPA)与Fc段结合的特性将ZEN的单克隆抗体定向固定在电极上,通过测量抗体抗原免疫复合物的物理变化所得到的生物传感器应用于ZEN的检测。在最优条件下,ZEN的线性范围为0.005~50 ng/mL,LOD为1.5 pg/mL。SHAO等<sup>[27]</sup>通过将碳量子点封装在分子印迹聚合物材料中,开发了一种新型的环保型荧光猝灭材料作为ZEN传感器,用于玉米中ZEN的灵敏检测,检测限为0.02 mg/L。LI等<sup>[28]</sup>制备了石墨烯氧化金纳米复合材料(GO/AuNCs)作为一种新型荧光猝灭平台,结合杂交链式反应扩增,用于AFB<sub>1</sub>的超灵敏检测,LOD为0.03 pg/mL,该方法可以有效地检测花生样品中AFB<sub>1</sub>的含量。尽管碳纳米材料在研究上是切实可行的,但碳纳米材料表面的粘附性仍然有待考究,在日常的应用中仍然非常有限。

## 1.3 磁性纳米材料

磁性纳米材料是一种同时具有纳米效应和磁性能的材料,一般由磁芯和包裹在磁芯上的高分子量聚合物/硅/羟基磷灰石壳层组成,其中包括铁、钴或镍等金属氧化物。最常见的核心层是由Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>或 $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>制成,具有超顺磁性或铁磁性<sup>[29]</sup>。磁性纳米材料由于其表面积大、传质性好、具有独特的物理化学性质、选择性吸附能力好、与生物分子的生物相容性好、易于分离、表面修饰和生产等特点,近年来人们对其进行了大量的研究。氧化铁纳米粒子被广泛用于食品分析、蛋白质纯化和酶固定化中<sup>[29]</sup>,并且Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Au和Ag可用于修饰磁性纳米粒子(magnetic nanoparticles, MNPs)的表面<sup>[30]</sup>。WANG等<sup>[31]</sup>以Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>复合纳米材料为模拟酶建立了检测谷物和

豆类食品中 OTA 的比色传感器, LOD 可达到 30 pg/mL。URUSOV 等<sup>[32]</sup>通过共沉淀法制备了 MNPs, 再和抗体通过物理吸附法形成非共价复合物, 形成的复合物与存在于测试溶液中的抗原结合, 然后用磁场分离抗原, 以达到快速检测受污染食品中 AFB<sub>1</sub> 的目的, LOD 为 20 pg/mL, 实现了在有机萃取剂含量较高的环境中测定 AFB<sub>1</sub>。HAO 等<sup>[33]</sup>用金纳米粒子 (AuNPs) 功能化硅包覆氧化铁磁性纳米粒子 (mSiO<sub>2</sub>@Au) 和碲化镉量子点 (CdTe QDs) 修饰的石墨烯/AuNPs 纳米复合材料 (GAu/CdTe) 制备了一种超灵敏的 OTA 电化学传感器, 线性范围为 0.2 ~ 4 pg/mL, LOD 为 0.07 pg/mL, 该方法在食品安全监测和临床诊断中具有很大的潜力。HENDRICKSON 等<sup>[34]</sup>采用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (N1-((ethy-limino) methylene)-N3, N3-dimethylpropane-1, 3-diamine, EDC) 法制备了磁性铁纳米粒子与 ZEN 的抗体复合物, 在 ZEN 的存在下, 结合传统的过氧化物酶标记物并催化高灵敏度的化学发光底物, 实现对葡萄酒中 ZEN 的测定, LOD 为 0.06 ng/mL。但磁性纳米材料与其他纳米材料相比, 更易氧化和团聚, 导致吸附量大大降低。

#### 1.4 量子点

量子点 (quantum dots, QDs) 作为半导体纳米晶体, 一般是由 Zn、Cd 和 Te、Se 组成的化合物, 表现出独特的光学和电子性质, 如高量子产率、高摩尔消光系数、高耐光漂白、宽吸收光谱、窄而对称的发射带、大小可调、化学降解等优良性能, 在分析化学领域极具吸引力<sup>[3,35-36]</sup>; 并且量子点由于其物理特性而成为理想的显像剂, 还为基因分析、诊断和药物发现提供了新的工具<sup>[37]</sup>, 并在许多情况下, 它们通常结合高特异性的生物分子, 如抗体和适配体, 而不影响其发射特性或适配体/抗体特异性。DUAN 等<sup>[38]</sup>通过微乳液法合成了量子点微球, 将激发在 575 和 615 nm 的 CdSe/ZnS QDs 包裹在量子点微球中, 合成了具有黄色、橙色和红色发光特性的 3 种量子点荧光微球, 将之分别与抗 ZEN、OTA、FB<sub>1</sub> 的单克隆抗体偶联, 在 10 min 内对 ZEN、OTA、FB<sub>1</sub> 的 LOD 分别达到 10、5、20 ng/mL, 实现了对玉米样品中 ZEN、OTA 和 FB<sub>1</sub> 这 3 种真菌毒素的定性联检。GUO 等<sup>[39]</sup>将分子印迹技术与量子点技术相结合, 合成了基于 MIP@CdTe QDs 的新型荧光传感器, 用于对 AFB<sub>1</sub> 的快速特异性识别, LOD 达到 4 ng/g。该方法成功地应用于实际样品中 AFB<sub>1</sub> 的定量测定。ZHANG 等<sup>[40]</sup>用氨基功能化的

核/多壳量子点 (QDs) 和抗 DON 的单克隆抗体偶联物作为荧光检测探针, 建立了一种灵敏可靠的直接竞争荧光标记免疫吸附法, 在优化条件下, LOD 为 12.2 μg/kg, 实现了在玉米样品中 DON 的快速、灵敏、高效检测。但量子点目前没有比较完善的合成技术, 种类不多, 与生物大分子结合会存在非特异性吸附, 其稳定性、生物毒性和性能还有待于研究与开发。

#### 1.5 上转换荧光纳米颗粒

上转换纳米粒子 (up-conversion nanoparticles, UCNPs) 是一种新型的发光材料, 能将低能量的近红外辐射转化为高能量的可见辐射。其以低背景噪声、高光稳定性、低毒性、对组织的信号穿透能力强、吸收能力弱等特点, 受到了各领域的广泛关注<sup>[41]</sup>。WU 等<sup>[42]</sup>采用戊二醛法制备了人工抗原修饰的氨基化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性纳米颗粒和抗体功能化上转化纳米颗粒作为信号探针, 建立了一种新型的、灵敏的联检食品样品中 AFB<sub>1</sub> 和 OTA 的免疫分析方法, 竞争模式下 AFB<sub>1</sub> 和 OTA 在最佳条件下的 LOD 均为 0.01 ng/mL, 线性范围为 0.01 ~ 10 ng/mL, 该方法已成功应用于测定天然污染玉米样品中的 AFB<sub>1</sub> 和 OTA。SUN 等<sup>[43]</sup>用单克隆抗体修饰 NaYF<sub>4</sub>:Yb, Er (NaYF) 纳米颗粒, 其中 NaYF<sub>4</sub> 作为基质材料, Yb<sup>3+</sup> 作为敏化剂, Er<sup>3+</sup> 作为激活剂, 制备了荧光探针, 用抗原修饰磁性纳米粒子制成免疫传感探针, 对 AFB<sub>1</sub> 进行检测, 线性范围为 0.2 ~ 100 ng/mL, LOD 为 0.2 ng/mL, 该方法可用于花生油或其他谷物中真菌毒素的快速筛查。张莹莹等<sup>[44]</sup>制备了水溶性的上转换荧光纳米材料, 并在其表面修饰了 OTA 适配体作为能量供体探针, 在金纳米粒子表面修饰了 OTA 适配体互补链作为能量受体探针, 建立了荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的传感方法检测 OTA, 其线性范围为 0.001 ~ 10 ng/mL, 检出限为 0.001 ng/mL, 且显示能特异性地检测实际样品啤酒中的 OTA。但想要得到尺寸和形貌可控、发光性能好的上转换荧光纳米颗粒的有效合成方法和表面修饰功能化方法不多, 且发光效率在很大程度上取决于上转换的基质材料, 限制了其在真菌毒素检测中的应用。

此外, 金属有机骨架 (metal organic framework, MOF) 和共价有机框架 (covalent organic framework, COF) 因其独特的性质在真菌毒素中也得到了广泛的应用。BAGHER 等<sup>[45]</sup>通过在片状 MOF 的纳米孔内制备银纳米粒子 (AgNPs), 合成了 AgNPs@ZnMOF 复合材料, 以展青霉素为模板, 通过 3-氨基丙基三乙氧

基硅烷和正硅酸四乙酯单体的共聚合,在 AgNPs@ ZnMOF 表面形成分子印迹聚合物 (molecular imprinted polymer, MIP) 层,利用 MIP 的选择性识别特征和新型 AgNPs@ ZnMOF 纳米复合材料优异的过氧化物活性,以及灵敏的荧光检测系统,设计了一种可靠的展青霉素探针,并成功用于展青霉素的选择性测定。其线性范围为 0.1 ~ 10  $\mu\text{mol/L}$ , LOD 为 0.06  $\mu\text{mol/L}$ 。该方法能够选择性地在复杂介质中测量展青霉素,不受类似物的干扰。Gu 等<sup>[46]</sup>首次研制了基于金纳米粒子 (AuNPs) 掺杂分子印迹层和共价有机骨架复合物 (COFs-AuNPs) 的石英晶体微平衡传感器用于检测 AFB<sub>1</sub>,其线性范围为 0.05 ~ 75 ng/mL, LOD 为 2.8 pg/mL。目前,MOFs 的水稳定性差,结构在溶液中容易坍塌,选择性有限,因此有研究者结合 MOFs 和 COFs 的优点实现对酶的包封,大大提高酶的装载率以及酶活性<sup>[47]</sup>。

## 2 噬菌体展示技术

噬菌体展示技术是 20 世纪 80 年代逐步建立并发展起来的一项分子生物学新技术。该技术可以构建抗体库、随机肽库、蛋白质突变体库和 cDNA 文库等,不仅广泛用于单链抗体的筛选、人源单克隆抗体的制备、先导化合物的筛选、药物筛选、细胞信号传导、基因表达调控、疫苗的研制、制药、免疫学、蛋白质工程、医学诊断、抗肿瘤<sup>[48]</sup>等研究领域,还已成为寻找高亲和力生物活性配体分子、探索受体与配体之间的相互作用位点、检测未知蛋白空间结构表位的工具<sup>[49]</sup>。目前,用于构建展示文库的噬菌体主要有丝状噬菌体、 $\lambda$  噬菌体、T4 噬菌体和 T7 噬菌体。单链丝状噬菌体展示系统为 pIII、pVIII 展示系统及其他展示系统; $\lambda$  噬菌体展示系统中 gpD 可作为外源序列融合的载体,这种展示一般为 N 端展示;T4 噬菌体展示系统为 SOC 位点的 C 末端和 HOC 位点的 N 末端;T7 噬菌体展示系统是通过 C 端融合表达蛋白,插入片段被克隆到 T7 噬菌体载体基因 10 的 C 端,各系统各有优缺点。

### 2.1 噬菌体展示技术筛选的模拟表位在真菌毒素检测中的应用

噬菌体展示技术是一种快速、经济、有效的新型分子探针技术,它可以从一个巨大的随机文库中筛选特定的配体,并产生独特的多肽、蛋白和抗体,这些蛋白和抗体能够高亲和力和高特异性地与目标结合。何庆华等<sup>[50]</sup>以抗 ZEN 单克隆抗体为配体,利用噬菌体七肽库经 3 轮淘选后成功淘选到 ZEN 的模拟表

位,其氨基酸序列分别为 DAVILLM 及 HHCHWWH, ELISA 显示 2 种序列均为阳性克隆,对 ZEN 毒素的抑制率达 90% 以上,检测线性范围为 0.1 ~ 10 mg/L。HE 等<sup>[51]</sup>以 OTA 为模型系统,通过二代肽文库筛选,分离得到 1 株十二肽型寡聚体,建立了 OTA 的化学发光 ELISA 检测方法,线性范围为 0.006 ~ 0.245 ng/mL,并将其用于试纸条中,肉眼可视截止水平为 1 ng/mL。ZOU 等<sup>[52]</sup>利用商品化的 7 肽肽库经过 4 轮生物鉴定完成后,鉴定出 30 个克隆为阳性噬菌体颗粒,这些噬菌体的颗粒 DNA 测序结果显示了 6 种不同的肽序列,其中肽序列为 GMVQTIF 的噬菌体颗粒对 OTA 检测的敏感性最高。因此设计了生物素化的 12 聚体肽 GMVQTIF-GGGSK-biotin 作为竞争性抗原,建立竞争性肽 ELISA。LOD 为 0.001 ng/mL,线性范围为 0.005 ~ 0.2 ng/mL,其作为竞争性抗原的效率大约是 OTA-HRP 偶联物的 5 倍。反应动力学表明,生物素化 12 聚体肽对抗 OTA 单克隆抗体的亲和力低于常规化学 OTA 抗原。该方法可用于食品安全监测中其他有毒小分子的敏感检测。

### 2.2 噬菌体展示技术筛选的重组抗体在真菌毒素检测中的应用

目前,利用噬菌体展示技术制备抗真菌毒素单链抗体的真菌毒素有玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、橘霉素等。噬菌体显示抗体片段制备简单、毒性低,包括重链可变区域 (VHH)、单链可变片段 (scFv) 和抗原结合片段 (Fab),VHH 具有毒性低、溶解度高、易于遗传编辑、产量高、重折叠能力强等特点,与 Fab 和 scFv 相比,Fab 和 scFv 更容易聚集,对目标亲和力较低,具有相当或更高的敏感性和亲和力,且具有优越的物理化学稳定性<sup>[53]</sup>。HE 等<sup>[54]</sup>构建了筛选 AFB<sub>1</sub> 抗体 (Nb) 的噬菌体展示文库,选择了 2 种 AFB<sub>1</sub> 特异性纳米体 Nb26 和 Nb28 进行 ELISA,线性范围分别为 0.117 ~ 5.676 和 0.171 ~ 6.431  $\mu\text{g/kg}$ 。WANG 等<sup>[53]</sup>以羊驼 VHH 噬菌体展示文库中的抗 ZEN 单克隆抗体 (mAb) 作为模板,经过 4 轮循环筛选,分离得到 1 个与抗 ZEN 单克隆抗体高度亲和的抗独特型抗体 VHH 噬菌体 Z1。基于 Z1 的 ZEN 噬菌体 ELISA 检测结果显示,线性范围为 0.11 ~ 0.55 ng/mL, LOD 为 0.08 ng/mL。此外,将 Z1 的噬菌体颗粒应用于免疫聚合酶链反应 (immuno-polymerase chain reaction, PD-IPCR) 中,提供了检测抗原和 DNA 模板。与噬菌体 ELISA 相比,Z1 在 PD-IPCR 的基础上 LOD 提高了

12 倍, LOD 为 6.5 pg/mL, 线性范围为 0.01 ~ 100 ng/mL。液相色谱-串联质谱验证了该方法的有效性, 结果表明, PD-IPCR 法用于谷物样品中 ZEN 的测定是可靠的, 利用抗独特型 VHH 噬菌体作为无毒代物和 PCR 的信号扩增功能, 使其在实际谷物 ZEN 分析中具有广阔的应用前景。SOMPUNGA 等<sup>[55]</sup>报道了利用噬菌体展示抗体技术筛选到 1 株对游离 ZEN 具有特异性的 scFv 克隆 yZEN2A8, 将编码 yZEN2A8 scFv 的基因亚克隆到 pET-21 d(+) 和 pKP300 III 载体中, 分别生成重组 scFv 和 scFv-Ap 抗体, 在优化条件下, 竞争性 ELISA 检测结果显示, 重组 yZEN2A8 scFv 抗体和 scFv-Ap 融合抗体的 IC<sub>50</sub> 分别为 90 ng/mL 和 14 ng/mL, LOD 分别为 20 ng/mL 和 2 ng/mL。同源模型显示了重组抗体与 ZEN 的特异性结合, 并证明了在抗体-抗原相互作用中, 可变重链和轻链的互补决定区的作用。

### 3 新型纳米材料结合噬菌体展示技术在真菌毒素检测中的应用

近年来, 噬菌体展示技术与纳米技术的结合在医学领域已经取得了巨大进展, 如医学诊断和监测、分子成像、靶向药物和基因传递、疫苗开发以及骨和组织修复等技术。噬菌体这种感染细菌的病毒是进行纳米操作的理想材料, 利用 DNA 合成、定点诱变和分子克隆等方法, 可以很容易地对其进行工程设计, 并将其作为制造纳米材料的多功能支架。Ngo-Duc 等<sup>[56]</sup>利用噬菌体与氯仿的反复混合使 900 nm 的丝状噬菌体浓缩成为直径 60 nm 的球状, 转化后的病毒保留了金的结合和矿化特性, 用于组装金胶体团簇和合成金纳米结构。YI 等<sup>[57]</sup>展示了基因工程的多功能 M13 噬菌体的 p8 主要外壳蛋白用来组装荧光单壁碳纳米管, p3 次要外壳蛋白用于前列腺肿瘤的靶向荧光成像。NGUYEN 等<sup>[58]</sup>利用噬菌体展示技术在 pVIII 衣壳蛋白上显示了富含半胱氨酸的多肽, 其作为硫醇供体被还原生成活性硫醇基团, 并与金包覆磁性纳米粒子高度凝聚结合, 形成磁性噬菌体模板; 再将特异性抗体和拉曼染料生物偶联在纳米颗粒表面制备成 SERS 基底, 通过抗体和抗原的特异性结合实现对脓毒症的检测。HUANG 等<sup>[59]</sup>将 M13 病毒作为一种多功能的生物支架, 在其病毒衣壳上以分子精度装配荧光团, 开发了 M13 病毒、花青素 3 染料和银纳米颗粒的联合装配; 通过调节纳米颗粒大小以及纳米颗粒与染料之间的距离, 实现了高达 24 倍的花青素

3 的增强发射; 且荧光随着病毒衣壳上染料表面密度的增加而增强, 从而创建了一种能够精确结合分子并具有高发射率的荧光探针。GUO 等<sup>[60]</sup>利用噬菌体的抗体片段的克隆化和表达系统成功筛选到能够特异性识别炭疽芽孢杆菌的单克隆抗体 8G3, 将其插入到噬菌体 M13KO7 的 gp3 蛋白基因上; gp8 蛋白基因上插入金结合肽序列 VSGSSPDS; 得到的噬菌体颗粒同时在噬菌体末端展示抗体及多个结合金肽拷贝, 构建了一个双功能噬菌体; 将银增强技术应用于噬菌体酶联免疫吸附检测信号, 结果显示炭疽芽孢杆菌灵敏度为  $5 \times 10^3$  CFU, 比传统的噬菌体免疫试验提高 10 倍。目前, 纳米材料与噬菌体展示技术在食品中的应用主要集中在食源性致病菌、病原菌检测等方面, 在真菌毒素检测中的应用还较少报道。

### 4 结论与展望

综上所述, 纳米材料可以通过疏水作用、氢键作用、静电作用、共价作用和  $\pi$ - $\pi$  堆叠作用等有效地捕获真菌毒素。虽然各种纳米材料都各有其优缺点, 但不同种类的纳米材料组合起来能明显提高真菌毒素的检测灵敏度。利用噬菌体展示技术淘选真菌毒素模拟表位肽, 用这些模拟表位肽替代检测中的毒素标品, 降低抗体制备成本, 减轻对操作人员和环境的危害, 最重要的是噬菌体还可作为纳米材料的支架, 制备多种检测探针, 检测食源性致病菌、病原菌。虽然纳米材料与噬菌体展示技术分别在真菌毒素检测中都有很广泛的应用, 但其结合技术在真菌毒素检测方面还处于实验室阶段, 然而实验结果已昭示新型纳米材料与噬菌体展示技术的结合无疑会引导未来对真菌毒素绿色、经济、高灵敏检测的潮流。

### 参 考 文 献

- [1] PINTO A P A V. Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2017, 14: 50 - 60.
- [2] AGRIOPOULOU S, STAMATELOPOULOU E, VARZAKAS T. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods[J]. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2020, 9(2): 137.
- [3] PEREIRA V L F J O C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, 36(2): 96 - 136.
- [4] ALSHANNAQ A, YU J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017, 14(6): 632.
- [5] CHEN C, WU F. The need to revisit ochratoxin A risk in light of diabetes, obesity, and chronic kidney disease prevalence[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 103: 79 - 85.

- [6] MCMILLAN A,RENAUD J B,BURGESS K M N,et al. Aflatoxin exposure in Nigerian children with severe acute malnutrition[J]. Food and Chemical Toxicology,2018,111:356–362.
- [7] YANG Y,LI G,WU D,et al. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs[J]. Trends in Food Science & Technology,2020,96:233–252.
- [8] KRSKA R,WELZIG E,BOUDRA H. Analysis of Fusarium toxins in feed[J]. Animal Feed Science and Technology,2007,137(3–4):241–264.
- [9] MARIN S,RAMOS A J,CANO-SANCHO G,et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment[J]. Food and Chemical Toxicology,2013,60:218–237.
- [10] RIZVIS A A,SALEH A M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology[J]. Saudi Pharmaceutical Journal,2018,26(1):64–70.
- [11] KAITTANIS C,SANTRA S,PEREZ J M. Emerging nanotechnology-based strategies for the identification of microbial pathogenesis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews,2010,62(4):408–423.
- [12] JANS H,HUO Q. ChemInform Abstract: Gold-nanoparticle-enabled biological and chemical detection and analysis[J]. ChemInform,2012,41(7):2 849–2 866.
- [13] JEEVANANDAM J,BARHOUM A,CHAN Y S,et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations[J]. Beilstein Journal of Nanotechnology,2018,9(1):1 050–1 074.
- [14] EL-SAYED A,KAMEL M. Advances in nanomedical applications: Diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production[J]. Environmental Science and Pollution Research,2020,27(16):19 200–19 213.
- [15] PIRO B,REISBERG S. Recent advances in electrochemical immunosensors[J]. Sensors,2017,17(4):794.
- [16] LAN L Y,YAO Y,PING J F,et al. Recent progress in nanomaterial-based optical aptamer assay for the detection of food chemical contaminants[J]. ACS Applied Materials & Interfaces,2017,9(28):23 287–23 301.
- [17] LAN L Y,YAO Y,PING J F,et al. Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection[J]. Biosens Bioelectron,2017,91:504–514.
- [18] DAI S,WU S,DUAN N,et al. A luminescence resonance energy transfer based aptasensor for the mycotoxin ochratoxin A using up-conversion nanoparticles and gold nanorods[J]. Microchimica Acta,2016,183(6):1 909–1 916.
- [19] MORENO V,MORENO V,ZOUGAGH M,et al. Hybrid nanoparticles based on magnetic multiwalled carbon nanotube-nano  $C_{18}SiO_2$  composites for solid phase extraction of mycotoxins prior to their determination by LC-MS[J]. Microchimica Acta,2016,183(2):871–880.
- [20] 马小明,孙密,林悦,等. 基于金纳米材料的可视化生物传感器的研究进展[J]. 分析化学,2018,46(1):1–10.  
MA X M,SUN M,LIN Y,et al. Progress of visual biosensor based on gold nanoparticles[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2018,46(1):1–10.
- [21] URUSOV A E,ZHERDEV A V,DZANTIEV B B. Use of gold nanoparticle-labeled secondary antibodies to improve the sensitivity of an immunochromatographic assay for aflatoxin  $B_1$  [J]. Microchimica Acta,2014,181(15–16):1 939–1 946.
- [22] HE H,SUN D,PU H,et al. Bridging  $Fe_3O_4$ @Au nanoflowers and Au@Ag nanospheres with aptamer for ultrasensitive SERS detection of aflatoxin  $B_1$  [J]. Food Chemistry,2020,324:126 832.
- [23] ZHANG J,XU X,LIANG Y. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A detection using AgPt bimetallic nanoparticles decorated iron-porphyrinic metal-organic framework for signal amplification[J]. Sensors and Actuators B:Chemical,2020,312:127 964.
- [24] HUANG X,AGUILAR Z P,XU H,et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review[J]. Biosensors and Bioelectronics,2016,75:166–180.
- [25] YANG C,DENNO M E,PYAKUREL P,et al. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: A review[J]. Analytica Chimica Acta,2015,887:17–37.
- [26] LIU N,NIE D,TAN Y,et al. An ultrasensitive amperometric immunosensor for zearalenones based on oriented antibody immobilization on a glassy carbon electrode modified with MWCNTs and AuPt nanoparticles[J]. Microchimica Acta,2017,184(1):147–153.
- [27] SHAO M,YAO M,SAEGER S D,et al. Carbon quantum dots encapsulated molecularly imprinted fluorescence quenching particles for sensitive detection of zearalenone in corn sample[J]. Toxins,2018,10(11):438.
- [28] LI Z,XUE N,MA H,et al. An ultrasensitive and switch-on platform for aflatoxin  $B_1$  detection in peanut based on the fluorescence quenching of graphene oxide-gold nanocomposites[J]. Talanta,2018,181:346–351.
- [29] CAO M,LI Z,WANG J,et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis[J]. Trends in Food Science & Technology,2012,27(1):47–56.
- [30] SHARIFI S V S Z A. Detection of pathogenic bacteria via nanomaterials-modified aptasensors[J]. Biosensors & Bioelectronics,2019,150:111 933.
- [31] WANG C Q J W K. Colorimetric aptasensing of ochratoxin A using Au@ $Fe_3O_4$  nanoparticles as signal indicator and magnetic separator[J]. Biosens. Bioelectron,2016,77:1 183–1 191.
- [32] URUSOV A E,PETRAKOVA A V,VOZNIAM M V,et al. Rapid immunoenzyme assay of aflatoxin  $B_1$  using magnetic nanoparticles[J]. Sensors (Basel,Switzerland),2014,14(11):21 843–21 857.
- [33] HAO N,JIANG L,QIAN J,et al. Ultrasensitive electrochemical ochratoxin A aptasensor based on cdte quantum dots functionalized graphene/Au nanocomposites and magnetic separation[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry,2016,781:332–338.
- [34] HENDRICKSON O D,CHERTOVICH J O,ZHERDEV A V,et al. Ultrasensitive magnetic ELISA of zearalenone with pre-concentration and chemiluminescent detection[J]. Food Control,2018,84:330–338.
- [35] BONILLA J C,BOZKURT F,ANSARI S,et al. Applications of quantum dots in food science and biology[J]. Trends in Food Science & Technology,2016,53:75–89.
- [36] ZHANG L,YING Y B,LI Y B,et al. Integration and synergy in protein-nanomaterial hybrids for biosensing: Strategies and in-field detection applications[J]. Biosensors and Bioelectronics,2020. DOI:10.1016/j.bios.2020.112036.
- [37] EL-SAYED A,KAMEL M. Advanced applications of nanotechnology in veterinary medicine[J]. Environmental Science and Pollution Research International,2018,27(16):19 073–19 086.
- [38] DUAN H,LI Y,SHAO Y,et al. Multicolor quantum dot nanobeads for simultaneous multiplex immunochromatographic detection of mycotoxins in maize[J]. Sensors and Actuators B:Chemical,2019,291:411–417.
- [39] GUO P,YANG W,HU H,et al. Rapid detection of aflatoxin  $B_1$  by

- dummy template molecularly imprinted polymer capped CdTe quantum dots [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411 (12): 2 607 – 2 617.
- [40] ZHANG X, YU X, WANG J, et al. One-step core/multishell quantum dots-based fluorimmunoassay for screening of deoxynivalenol in maize [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11 (9): 2 569 – 2 578.
- [41] ZHANG J, CHENG F, LI J, et al. Fluorescent nanoprobe for sensing and imaging of metal ions: Recent advances and future perspectives [J]. *Nano Today*, 2016, 11 (3): 309 – 329.
- [42] WU S, DUAN N, ZHU C, et al. Magnetic nanobead-based immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A using upconversion nanoparticles as multicolor labels [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 30 (1): 35 – 42.
- [43] SUN C, LI H, KOIDIS A, et al. Quantifying aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut oil using fabricating fluorescence probes based on upconversion nanoparticles [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 165: 120 – 126.
- [44] 张莹莹, 钱志娟, 谢正军, 等. 基于上转换荧光纳米粒子和金纳米粒子间荧光共振能量转移的高灵敏赭曲霉毒素 A 检测方法研究 [J]. *分析测试学报*, 2018, 37 (1): 31 – 38.
- ZHANG Y Y, QIAN Z J, XIE Z J, et al. Highly sensitive detection of ochratoxin a based on FRET from upconversion nanoparticles to gold nanoparticles [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37 (1): 31 – 38.
- [45] BAGHERI N, KHATAEE A, HABIBI B, et al. Mimetic Ag nanoparticle/Zn-based MOF nanocomposite (AgNPs@ ZnMOF) capped with molecularly imprinted polymer for the selective detection of patulin [J]. *Talanta*, 2018, 179: 710 – 718.
- [46] GU Y, WANG Y, WU X, et al. Quartz crystal microbalance sensor based on covalent organic framework composite and molecularly imprinted polymer of poly (o-aminothiophenol) with gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 291: 293 – 297.
- [47] LI M, QIAO S, ZHENG Y, et al. Fabricating covalent organic framework capsules with commodious microenvironment for enzymes [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142 (14): 6 675 – 6 681.
- [48] 郭亭亭, 刘平, 罗永艾. 噬菌体在癌症治疗研究中的应用 [J]. *世界科技研究与发展*, 2012, 34 (3): 482 – 484; 496.
- WU T T, LIU P, LUO Y A. Applications of phages in cancer treatment studies [J]. *World Sci-Tech R & D*, 2012, 34 (3): 482 – 484; 496.
- [49] ZANGANEH S, ROUHANI NEJAD H, MEHRABADI J F, et al. Rapid and sensitive detection of staphylococcal enterotoxin B by recombinant nanobody using phage display technology [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 187 (2): 493 – 505.
- [50] 何庆华, 刘仁荣, 许杨. 利用噬菌体肽库筛选玉米赤霉烯酮的模拟表位 [J]. *食品科学*, 2007, 28 (8): 241 – 243.
- HE Q H, LIU R R, XU Y. Biopanning of zearalenone mimotope by phage displayed peptide bank [J]. *Food Science*, 2007, 28 (8): 241 – 243.
- [51] HE Z, HE Q, XU Y, et al. Ochratoxin A mimotope from second-generation peptide library and its application in immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85 (21): 10 304 – 10 311.
- [52] ZOU X Q, CHEN C C, HUANG X L, et al. Phage-free peptide ELISA for ochratoxin A detection based on biotinylated mimotope as a competing antigen [J]. *Talanta*, 2016, 146: 394 – 400.
- [53] WANG X, HE Q, XU Y. Anti-idiotypic VHH phage display-mediated immuno-PCR for ultrasensitive determination of mycotoxin zearalenone in cereals. [J]. *Talanta*, 2016: 410 – 415.
- [54] HE T W Y L. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (17): 8 873 – 8 880.
- [55] SOMPUNGA P, PRUKSAMETANAN N, RANGNOI K, et al. Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology [J]. *Talanta*, 2019, 201: 397 – 405.
- [56] NGO-DUC T, PLANK J M, CHEN G, et al. M13 bacteriophage spheroids as scaffolds for directed synthesis of spiky gold nanostructures [J]. *Nanoscale*, 2018, 10 (27): 13 055 – 13 063.
- [57] YI H, GHOSH D, HAM M, et al. M13 Phage-functionalized single-walled carbon nanotubes as nanoprobe for second near-infrared window fluorescence imaging of targeted tumors [J]. *Nano Letters*, 2012, 12 (3): 1 176 – 1 183.
- [58] NGUYEN A H, SHIN Y, SIM S J. Development of SERS substrate using phage-based magnetic template for triplex assay in sepsis diagnosis [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 85: 522 – 528.
- [59] HUANG S, QI J, DEQUILLETES D W, et al. M13 Virus-based framework for high fluorescence enhancement [J]. *Small*, 2019, 15 (28): 1 901 233.
- [60] GUO Y, LIANG X, ZHOU Y, et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 396 (1): 155 – 157.

## Application of new nanomaterials and phage display technology in mycotoxin detection

FENG Lin, CHEN Xuelan\*

(School of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

**ABSTRACT** Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by some fungi during growth and reproduction. They have carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects, which seriously endanger human health. Therefore, their detection and control are of great importance. However, the existing detection methods generally have the disadvantages of complex sample pretreatment, high cost and cumbersome operation, and may cause potential secondary hazards to operators and the environment. The detection sensitivity of mycotoxins can be improved with new nanomaterials, and the mimic epitopes of mycotoxins and the recombinant antibodies against mycotoxins can be screened through phage display technology, hence reducing the detection cost and achieving the purpose of non-toxic detection. The recent application of different nanomaterials and phage display technology and their combination in mycotoxin detection were reviewed, and the future development is prospected.

**Key words** mycotoxins; new nanomaterials; phage display technology; non-toxic testing; sensitivity; mimic epitopes