

· 论著 ·

一种可用于赭曲霉毒素免疫检测小分子多肽OTA-1的筛选与鉴定*

梁琳 孔德静 宫秋玲 宋树静 俞沙沙 曾丫丫 梁丽 鞠志刚*
贵州中医药大学药学院(贵州 贵阳 550025)

【摘要】目的 本研究首次筛选得到一种能够与赭曲霉毒素抗体特异性结合的小分子多肽(OTA-1)序列(QFQLHSMPTSL), 并利用该多肽进行中药材赭曲霉毒素免疫检测研究。**方法** 从噬菌体随机展示12肽库中, 经过3轮生物淘选后, 随机挑选了30个克隆, 其中29个克隆序列与OTA-1完全一致, 并通过滴度测定和Western blotting实验, 对OTA-1多肽与赭曲霉毒素抗体的亲和力进行了验证。**结果** 通过竞争性ELISA方法, 确定了最佳包被浓度和噬菌体浓度, 分别为0.5 μ g/孔和4 \times 10¹⁰ pfu/mL。与商品化的ELISA检测试剂盒相比较, 本研究开发的噬菌体ELISA检测方法可以用于中药材赭曲霉毒素的检测。**结论** 表面展示有OTA-1多肽的噬菌体与赭曲霉毒素是一种竞争关系, 都能够识别赭曲霉毒素抗体并与其结合, 这为真菌毒素的免疫检测提供了一种新的策略。

【关键词】噬菌体; 真菌毒素; 免疫检测

【中图分类号】R392.12

【文献标识码】A

【基金项目】噬菌体展示技术在中药材赭曲霉毒素检测中的应用研究(黔科合基础[2019]1019号)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2024.11.051

The Screening and Identification of Small Molecule Peptides OTA1 for Immunoassay of Ochratoxin*

LIANG Lin, KONG De-jing, GONG Qiu-ling, SONG Shu-jing, YU Sha-sha, ZENG Ya-ya, LIANG Li, JU Zhi-gang*.
Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou Province, China

Abstract: Objective This study is the first time to screen the small molecule polypeptide (OTA-1) sequence (QFQLHSMPTSL) that can specifically bind to ochratoxin antibody, and to study the immunoassay of ochratoxin. **Methods** After three rounds of bio-screening, 30 clones were randomly selected, of which 29 clones were completely identical with OTA-1, and the affinity and specificity of the small molecule peptide OTA-1 were verified by titer determination and Western blotting experiments. **Results** After a competitive ELISA analysis, the optimal inclusion concentration and phage concentration were 5.0 μ g/well and 4 \times 10¹⁰ pfu/mL. Competed with industrial ELISA kit, the method based on phage ELISA could used to detect ochratoxin in Chinese medicinal herbs. **Conclusion** So both the phage displayed with OTA-1 peptides and ochratoxin can bind with anti-ochratoxin antibodies, which showed a competitive relationship between them. This provide a new strategy for ochratoxin detection in the future.

Keywords: Phage; Ochratoxin; Immunodetection

真菌毒素是由真菌产生一类痕量小分子次级代谢产物, 广泛分布于谷物、牛奶、果蔬、中药材等生活消费品中。长期摄入真菌毒素会引发变异、畸形、肝脏/肾脏中毒、激素紊乱等慢性疾病, 对人类健康造成极大的危害^[1-2]。因此, 严格控制消费品中真菌毒素的含量, 并实现快速准确定量检测至关重要。目前, 各个国家广泛使用的较为可靠的检测方法是色谱检测方法, 主要有薄层色谱、高效液相色谱以及液相色谱-质谱联用等。但是, 以上这些方法对仪器设备的要求较高, 需要专业技术人员, 经济成本也相对较高, 而且不适合现场实时检测^[3-5]。而基于免疫学的化学检测方法, 如酶联免疫吸附法、化学发光免疫分析法、电化学生物传感器法以及免疫层析技术等, 凭借其高灵敏度, 强特异性, 操作简单等优势, 越来越受到人们的青睐^[6-8]。

丝状噬菌体是一种的长纤维病毒, 长约900nm, 直径约7nm, 由外壳蛋白和单链DNA组成。其中外壳蛋白又分为主要外壳蛋白(pVIII)和次要外壳蛋白(pIII、pVI、pVII、pIV)。借助分子生物学手段, 可以将外源基因插入到噬菌体DNA中, 外源基因会随着噬菌体侵入细菌后的复制而复制, 并编码产生与外壳蛋白融合表达的外源多肽, 并随着噬菌体自我组装而展示到噬菌体表面。该技术又被称作噬菌体展示技术, 最早是由美国的乔治·史密斯教授首次建立的^[9], 并因其在噬菌体方面的重大发现获得2018年诺贝尔化学奖。目前, 已经开发出了多种噬菌体展示系统, 并被广泛应用于结合位点筛选、药物运输、靶点发现、生物传感器等领域^[10-12]。在真菌毒素检测方案, 噬菌体展示技术的应用也取得了一些研究进展。通过构建一种在噬菌体表面随机展示一段长度为8个氨基酸的多肽文库, Yanru Wang等利用抗黄曲霉

毒素抗体为固定相, 筛选得到了黄曲霉毒素的小分子多肽, 并对黄曲霉毒素进行竞争ELISA检测, 灵敏度可以达到14.0 μ g/kg^[13]。除此之外, 噬菌体也被用于赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮等其他真菌毒素的免疫检测^[14-15]。

本研究从展示有随机12个氨基酸的多肽噬菌体文库中, 筛选并鉴定得到了OTA-1赭曲霉毒素模拟结合表位, 并利用展示有该多肽的噬菌体进行了中药材中赭曲霉毒素的竞争性ELISA的免疫检测, 证明了该技术的可行性。

1 实验材料

噬菌体12肽随机展示文库、赭曲霉毒素、抗赭曲霉毒素抗体、抗IgG-AP酶标二抗、HRP-抗M13噬菌体单克隆抗体、ER2738大肠杆菌、Hind III和Pst I限制性核酸内切酶。

2 研究方法

2.1 小分子多肽的噬菌体随机多肽文库筛选 以抗赭曲霉毒素抗体为固定抗原, 与展示有随机12个氨基酸的多肽噬菌体文库进行生物淘选。取抗赭曲霉毒素抗体2 μ L加入0.1 M NaHCO₃溶液(pH 8.6)150 μ L混合后(抗体终浓度为63 μ g/mL), 置于湿盒中, 4 $^{\circ}$ C过夜。第二天, 加入5 mg/mL BSA溶液, 于4 $^{\circ}$ C封闭至少1h。然后, 用0.1% TBST冲洗6-8次。接着, 加入100 μ L噬菌体随机多肽展示文库母液(~10⁹ pfu), 于37 $^{\circ}$ C振荡孵育10-60 min。再次用TBST冲洗后, 加入100 μ L 甘氨酸-盐酸溶液于37 $^{\circ}$ C振荡10-20min后, 加入15 μ L Tris-HCl(1.0 M)溶液, 得到第一轮筛选产物。在进行第二轮筛选前, 需要先进行噬菌体的大量繁殖。具

【第一作者】梁琳, 女, 主要研究方向: 植物次生代谢。E-mail: lianglin2028@163.com

【通讯作者】鞠志刚, 男, 副教授, 主要研究方向: 纳米医学。E-mail: juzhigangz@163.com

体方法如下：通过划线培养法活化ER2738大肠杆菌。然后，取单克隆于LB培养基中37℃过夜振荡培养。接着，按1:100比例接种到20 mL LB培养基中，200 rpm 37℃振荡培养10 min，至OD600达到0.5。最后，将第一轮筛选产物加入ER2738细胞培养液中，培养4.5-5h进行噬菌体的大量繁殖。通过PEG/NaCl沉淀法，制备并纯化噬菌体，并通过滴度测定法，测定所扩增噬菌体的滴度。取适量噬菌体扩增也进行第二轮生物淘选。

重复筛选3-5轮，筛选过程中所用洗脱液中Tween-80的浓度分别为0.1%、0.2%和0.5%。将最后一轮筛选所得噬菌体感染ER2738大肠杆菌后，离心收集细胞，在LB固体平板上涂布后，于37℃倒置过夜培养。第二天，随机挑取噬菌体克隆30个，扩增后进行基因测序。

2.2 展示OTA-1多肽噬菌体的表征 通过滴度测定法验证展示OTA-1多肽噬菌体对赭曲霉毒素抗体的亲和力，具体如下：首先，将抗体稀释后包被于ELISA板中，经BSA封闭后，每孔加入按倍比稀释的噬菌体孵育。然后，经TBST冲洗后，加入甘氨酸-盐酸洗脱结合的噬菌体，并加入适量Tris-HCl中和液。最后，用洗脱液的淑君提感染ER2738大肠杆菌，涂布平板过夜培养，测定噬菌体滴度。

借助免疫印迹实验，验证OTA-1多肽与抗赭曲霉毒素抗体的结合特异性。具体为：首先，通过SDS-PAGE凝胶电泳进行噬菌体电泳。然后，将噬菌体外壳蛋白转移到PVDF膜上，经过BSA封闭后，加入抗赭曲霉毒素抗体孵育，经过洗涤后，计入抗IgG-AP酶标二抗孵育。冲洗后，进行染色和显色反应，观察是否出现显色条带。

2.3 竞争ELISA条件优化 棋盘法测定抗赭曲霉毒素抗体的最佳抗体包被浓度和展示OTA-1噬菌体的最佳反应滴度。首先，在ELISA 96孔板上加入倍比稀释后的抗赭曲霉毒素抗体(浓度分别为0.0625 μg/mL, 0.125μg/mL, 0.25μg/mL, 0.5μg/mL, 1.0μg/mL, 2.0μg/mL, 每个浓度包被3孔)于湿盒中4℃过夜包被。第二天加入BSA于4℃封闭2 h。接着，每孔中加入赭曲霉毒素标准溶液(0.01 ng/μL)和倍比稀释后的展示有OTA-1多肽的噬菌体进行孵育(滴度分别为 6.4×10^7 pfu, 2.5×10^8 pfu, 2.5×10^9 pfu, 1.0×10^{10} pfu, 4×10^{10} pfu, 1.6×10^{11} pfu, 6.45×10^{11} pfu, 2.5×10^{12} pfu, 1.0×10^{13} pfu)。洗涤后，加入HRP-抗M13噬菌体抗体孵育。最后，加入显色底物显色后，于酶标仪上测定OD450处吸光值。

2.4 基于竞争性ELISA方法的中药材赭曲霉毒素检测 从当地药材市场购买杜仲、党参和铁皮石斛三种药材，每种药材四份，每份药材称取5 g，溶解于10 mL 50%的甲醇溶液中，超声处理20 min。常温条件下，4000 rpm离心10 min，取上清液，用PBS稀释40倍后用于ELISA检测分析。并与商品化的赭曲霉毒素检测试剂盒进行比较。

3 结果与分析

3.1 噬菌体文库筛选 经过滴度测定后发现，第一轮筛选所得噬菌体的滴度为 4.0×10^2 pfu，第二轮筛选得到的噬菌体滴度为 1.0×10^5 pfu，第三轮筛选所得噬菌体滴度为 7.0×10^6 pfu，表明从第一轮到第三轮筛选噬菌体滴度得到明显富集。到最后一轮筛选所得噬菌体进行测序后发现，在随机挑选的30个克隆中，其中有29个克隆所展示的多肽序列为QFQLHSMPTSL，命名为OTA-1，有1个克隆展示多肽的多肽序列为FQLHTPNPYPLT，命名为OTA-2。OTA-1和OTA-2多肽中均含有FQLH重复序列。30个克隆中20种氨基酸出现的频次具体见图1。

3.2 展示有OTA-1多肽噬菌体的亲和力验证 噬菌体滴度测定结果表明，展示有OTA-1和OTA-2多肽的两种噬菌体相比，展示有OTA-1多肽的噬菌体与抗赭曲霉毒素抗体结合的亲和力更强(见图2A)。另外，免疫印迹实验结果显示，展示有OTA-1多肽的噬菌体在其pIII外壳蛋白位置处出现了明显的特异性条带(见图2B)，表明展示有OTA-1多肽的噬菌体能够与抗赭曲霉毒素抗体特异性结合。

3.3 竞争ELISA条件优化 利用棋盘法分别对噬菌体滴度和抗体包被浓度进行优化，结果表明抗体的最佳包被浓度为0.5μg/孔，噬菌体的最佳滴度为 4×10^{10} pfu/mL(具体见图3)。

3.4 中药材赭曲霉毒素检测 选取杜仲、党参、铁皮石斛等12批次中药材作为检测对象，将样品进行提取分离后，用缓冲液按照1:10稀释后通过竞争ELISA法进行检测，结果见表1。与商品化的ELISA试剂盒相比，基于展示有OTA-1多肽的噬菌体ELISA检测法可以用于中药材赭曲霉毒素的检测，但灵敏度需进一步优化提升。

表1 中药材真菌毒素检测结果

样品编号	样品名称	商品化试剂盒检测(ng/mL)	基于噬菌体的ELISA检测
1	杜仲1	44.9	+
2	杜仲2	13.6	+
3	杜仲3	2.4	-
4	杜仲4	0.5	-
5	党参1	3.6	-
6	党参2	0	+
7	党参3	23.5	+
8	党参4	56.4	+
9	铁皮石斛1	43.5	+
10	铁皮石斛2	69.2	+
11	铁皮石斛3	18.5	+
12	铁皮石斛4	128	+

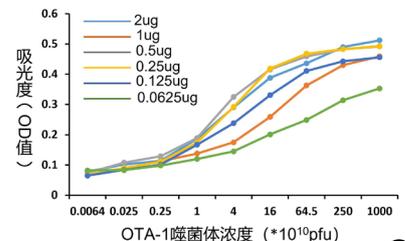
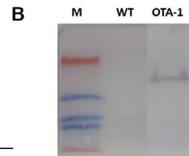
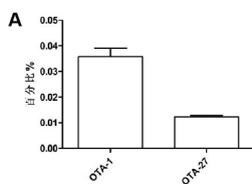
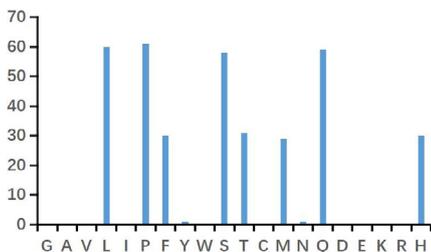


图1 OTA抗体结合多肽各氨基酸出现频次统计。图2 OTA-1和OTA-27的亲和力验证。图3 棋盘法测定OTA-1多肽与OTA抗体的最佳滴度与包被浓度。

4 总结

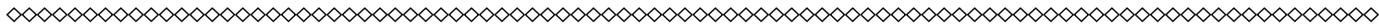
本研究通过噬菌体随机12肽展示文库筛选,获得了一种可与抗赭曲霉毒素抗体结合的OTA-1多肽,通过亲和力和特异性验证,表明该多肽能够特异性的识别赭曲霉毒素抗体,并且可以用于中药材赭曲霉毒素的检测,为基于噬菌体的真菌毒素检测提供了一种新的研究策略。

参考文献

[1] Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(1): 71-82.
 [2] Zain M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals[J]. Journal of Saudi Chemical Society, 2011, 15(2): 129-144.
 [3] Anfossi L, Giovannoli C, Baggiani C. Mycotoxin detection[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2015, 37(2016): 120-126.
 [4] 张思思, 陆继伟, 王少敏, 等. 国内外真菌毒素检测方法研究现状及进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2575-2586.
 [5] Shephard G S, Berthiller F, Dorner J, et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2008-2009[J]. World Mycotoxin Journal, 2011, 3(1): 3-23.
 [6] Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, et al. Lateral-flow immunoassays for mycotoxins and phycotoxins: a review[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(2): 467-480.
 [7] Chauhan R, Singh J, Sachdev T, et al. Recent advances in mycotoxins detection[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2016, 81(2016): 532-545.
 [8] 谢艳君, 杨英, 孔维军, 等. 基于不同纳米材料的侧流免疫层析技术在真菌毒素检测中的应用[J]. 分析化学, 2015, 43(4): 618-628.
 [9] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228(4705): 1315-1317.
 [10] Liu A, Abbineni G, Mao C B. Nanocomposite films assembled from genetically engineered filamentous viruses and gold nanoparticles: nanoarchitecture-

and humidity-tunable surface plasmon resonance spectra[J]. Advanced Materials, 2009, 21(9): 1001-1005.
 [11] Mao C B, Solis D J, Reiss B D, et al. Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires[J]. Science, 2004, 303(5655): 213-217.
 [12] Ghosh D, Lee Y, Thomas S, et al. M13-templated magnetic nanoparticles for targeted in vivo imaging of prostate cancer[J]. Nature Nanotechnology, 2012, 7(10): 677-682.
 [13] Wang Y, Wang H, Li P, et al. Phage-displayed peptides that mimic aflatoxins and its application in immunoassay[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(10): 2426-2433.
 [14] He Z Y, He Q H, Xu Y, et al. Ochratoxin a mimotope from second-generation peptide library and its application in immunoassay[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(21): 10304-10311.
 [15] Liu X, Xu Y, He Q H, et al. Application of mimotope peptides of fumonisin b1 in peptide ELISA[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(61): 4765-4770.

(收稿日期: 2023-09-25)
 (校对编辑: 韩敏求)



(上接第112页)

综上所述,尿毒症血透患者发生LS可能受患者害怕跌倒、铁缺乏、合并症多、中心型肥胖、营养和炎症程度重等因素影响。

参考文献

[1] 徐兰. 慢性肾衰竭血液透析患者血清1, 25(OH)2D3水平变化及与甲旁亢的相关性[J]. 罕少疾病杂志, 2021, 28(5): 65-66.
 [2] 肖晶, 鲁勤波, 潘华. CT血管成像在血液透析动静脉内瘘功能异常诊断中的应用[J]. 中国CT和MRI杂志, 2021, 19(2): 172-173, 176.
 [3] 付新萍, 赵英. 终末期尿毒症维持性血液透析患者运动功能的影响因素[J]. 医学临床研究, 2020, 37(10): 1483-1486.
 [4] 朱永光. 维持性血液透析病人运动能力现状及其影响因素分析[J]. 全科护理, 2020, 18(7): 789-792.
 [5] 崔雪岩, 李凤琴, 张金华, 等. 农村老年人运动障碍综合征与阈下抑郁现状及其相关性分析[J]. 护理研究, 2021, 35(12): 2106-2110.
 [6] 苏苗苗, 陈贞, 臧赫, 等. 农村老年人运动障碍综合征现状及其影响因素[J]. 护理学杂志, 2019, 34(17): 86-89.
 [7] 徐钢. 肾脏病诊疗指南[M]. 北京: 科学出版社, 2013: 215-219.
 [8] Binkley N, Krueger D, Buehring B. What's in a name revisited: should osteoporosis and sarcopenia be considered components of "dysmobility syndrome?" [J]. Osteoporosis Int, 2013, 24(12): 2955-2959.
 [9] 红儿, 齐玲, 许金华, 等. 维持性血液透析患者营养不良-炎症综合征与生存质量的相关性研究[J]. 浙江医学, 2019, 41(19): 2063-2066.
 [10] 马小扬, 脱厚珍, 林俊, 等. 尿毒症继发不安腿综合征73例临床表现分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20(1): 39-42.

[11] 冯子彦. 终末期肾脏病血液透析患者不安腿综合征[J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(1): 190-192.
 [12] 贺奇思, 应光辉, 陈兆桂, 等. 运动疗法对血透不宁腿综合征干预作用的荟萃分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2022, 23(10): 876-881.
 [13] 黄佩佩, 杨琴, 韩雨. 维持性血液透析患者发生营养不良的相关危险因素分析[J]. 罕少疾病杂志, 2023, 30(12): 70-71.
 [14] 刘倩, 鲁华, 蒲萌萌, 等. MRI与超声诊断长期血液透析患者透析相关性淀粉样变价值分析[J]. 中国CT和MRI杂志, 2021, 19(11): 186-188.
 [15] 朱张逸, 张昆, 李馨, 等. 维持性血液透析患者运动障碍综合征发生现状及影响因素分析[J]. 中华护理杂志, 2022, 57(21): 2578-2584.
 [16] 戴祺洁, 陶静, 华建武, 等. 维持性血液透析患者运动康复现状及影响因素分析[J]. 实用临床医药杂志, 2020, 24(10): 116-119.
 [17] 杨德玉, 王倩毅. 维持性血液透析患者肌少症发生的危险因素及对人体成分分析相关指标的影响[J]. 山西医药杂志, 2020, 49(19): 56-58.

(收稿日期: 2023-07-25)
 (校对编辑: 翁佳鸿)