

# 噬菌体展示肽库技术及其在农药残留免疫分析中的研究进展

华修德, 施海燕, 王鸣华\*

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

**摘要:** 噬菌体展示技术是一种特殊的基因工程重组表达技术, 已经作为一种强大的工具运用在不同的研究中, 包括筛选抗体和酶的配体、筛选小分子的受体、基因工程抗体等。免疫分析作为农药残留快速筛查技术被广泛研究, 利用抗体从噬菌体展示肽库中淘选竞争物, 可以加快异源免疫分析方法的建立; 利用抗原抗体复合物从噬菌体展示肽库中淘选抗免疫复合体多肽, 可建立非竞争免疫分析方法, 丰富农药的免疫分析模式。本文从噬菌体展示技术的原理、噬菌体展示肽库的构建和噬菌体展示肽库的筛选方面概述了噬菌体展示肽库技术; 从模拟表位筛选、抗免疫复合体筛选和新免疫分析方法方面阐述了噬菌体展示肽库技术在农药等小分子免疫分析中的应用; 并对噬菌体展示肽库技术的研究和应用前景进行了展望。

**关键词:** 噬菌体展示技术; 噬菌体展示肽库; 农药残留; 免疫分析

## Phage display peptide library technology and its research progress in immunoassay of pesticide residue

HUA Xiu-De, SHI Hai-Yan, WANG Ming-Hua\*

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**ABSTRACT:** Phage display technology (PDT) is a unique genetic engineering recombinant expression technology, which is a powerful tool for a variety of applications, including antibody engineering and the isolation of peptide ligands for antibodies and enzymes and peptide receptors for small molecules. Immunoassay had been widely studied as a rapid screening technique for pesticide residue, isolation of competitor from phage display peptide library by using antibody could accelerate the development of heterologous immunoassay; isolation of anti-immunocomplex peptide from phage display peptide library by using antigen-antibody complexes could develop noncompetitive immunoassay, and enriched immunoassay model for pesticide. This review concisely summarized phage display peptide library technology from the principle of phage display technology, the construction of phage display peptide library and screening of phage display peptide library. Applying phage display peptide library technology in immunoassay for pesticides and other small molecules were elaborated from screening of mimicking epitope, screening of anti-immunocomplex and the new immunoassays. Furthermore, this review presented insights for the study and application prospect

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471794)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (31471794)

\*通讯作者: 王鸣华, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农药残留与环境毒理。E-mail: wangmha@njau.edu.cn

\*Corresponding author: WANG Ming-Hua, Professor, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, NO. 1, Weigang, Xuanwu District, Nanjing 210095, China. E-mail: wangmha@njau.edu.cn

of the phage display peptide library technology.

**KEY WORDS:** phage display technology; phage display peptide library; pesticide residue; immunoassay

## 1 引言

农药等小分子污染物的残留危害越来越引起世界范围的关注, 农药残留污染控制的前提与基础是建立有效的残留检测技术体系。完善的农药残留检测体系应包括快速筛查技术作为初筛工具和以标准检测技术作为具有法律效力的定性定量确证工具。液相色谱法、气相色谱法、色谱-质谱连用法等作为农药的标准检测技术已经成功用于农药残留的检测<sup>[1-4]</sup>。相比色谱分析方法, 免疫分析技术具有简便、快速、低成本和能够同时对多个样品进行检测的特点, 并作为农药残留快速筛查技术被广泛研究<sup>[5,6]</sup>。

由于农药等小分子化学品为单抗原决定簇分析物, 整个分子只能和一个抗体结合, 所以通常选择竞争模式来建立免疫分析方法。在竞争模式的免疫分析方法中, 必须存在一个经过标记的竞争物, 通常是将半抗原与蛋白、酶或荧光物等连接制备获得<sup>[7]</sup>。根据竞争物与免疫抗原结构的同异, 可以将分析方法分为同源和异源免疫分析, 异源免疫分析的敏感性要远远优于同源免疫分析。但是系列异源半抗原的化学合成及半抗原与蛋白、酶或荧光物等的连接需要很大的工作量。从噬菌体展示肽库中淘选竞争物, 可以加快异源免疫分析方法的建立; 从噬菌体展示肽库中淘选抗免疫复合体多肽, 可建立非竞争免疫分析方法, 丰富小分子化学品的免疫分析模式。本文概述了噬菌体展示技术的原理、噬菌体展示肽库的构建、筛选, 着重介绍了噬菌体展示肽库技术在农药等小分子化合物免疫分析中的应用, 并对其前景进行了展望, 以期促进噬菌体展示肽库技术在农药残留分析中的研究及应用。

## 2 噬菌体展示技术的基本原理

从噬菌体展示技术第一次报道至今<sup>[8]</sup>, 其已经作为一种强大的工具运用在不同的研究中, 包括筛选抗体和酶的配体<sup>[9,10]</sup>、筛选小分子的受体<sup>[11,12]</sup>、基因工程抗体<sup>[13,14]</sup>等。噬菌体展示技术的原理是将多肽或蛋白质的编码基因或目的基因片段克隆入噬菌体外壳蛋白结构基因的适当位置, 在阅读框正确且不影响其他外壳蛋白正常功能的情况下, 使外源多肽或蛋白与外壳蛋白融合表达, 融合蛋白随子代噬菌体的重新组装而展示在噬菌体表面。被展示的多肽或蛋白可以保持相对独立的空间结构和生物活性, 以利于靶分子的识别和结合。通过反复亲和淘选和扩增, 可直接获得能够与靶分子结合的噬菌体展示多肽或蛋白质, 并可分离出带有目的基因的噬菌体。

## 3 噬菌体展示肽库的构建

噬菌体展示随机多肽库的构建主要应用 M13 噬菌体展示系统。M13 噬菌体是 *E. coli* 专一性丝状噬菌体, 由蛋白质外壳及其包被的环状单链 DNA 组成, 通过接触性丝感染 *E. coli*。M13 全基因组包含 11 个基因, 其中 5 个编码衣壳蛋白即 p3、p6、p7、p8 和 p9 蛋白, 目前主要应用 p3 和 p8 蛋白介导的展示系统。此外, 已有一些展示系统和肽库被商品化, 如 NEB 公司(new england biolabs, Inc.) 的 Ph.D. Peptide Display Cloning System、Ph.D.-7<sup>TM</sup> Peptide Library、Ph.D.-12<sup>TM</sup> Peptide Library 和 Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> Peptide Library。

p3 蛋白位于噬菌体的一端, 每一个噬菌体有 3~5 个拷贝, 分子质量为 4.2 kD, 球形或线形, 406 个氨基酸残基, 分为 3 个结构域 N1、N2 和 CT。p3 蛋白介导噬菌体感染过程起始于 p3 蛋白之 N2 结构域先结合到菌毛顶端, 随后 N1 结构域与宿主细菌细胞周质空间的 TolA 蛋白相结合<sup>[15]</sup>。在 p3 蛋白的两个位点(N1 结构域和 CT 结构域)上均可实现外源蛋白的融合展示。将外源基因与 p3 蛋白基因融合, 在噬菌体装配过程中展示在噬菌体表面。由于是多价展示, 含有多个结合位点, 不容易筛选到高亲和力的展示噬菌体, 还极大地影响了噬菌体的感染能力。在使用噬菌体作为表达载体时, 噬菌体表面仅表达一个外源性蛋白分子, 有利于高亲和力配体或受体的淘选, 故在构建展示文库时常使用 p3 蛋白为载体来筛选高亲和力的配体<sup>[16]</sup>。

p8 蛋白是 M13 噬菌体的主要外壳蛋白, 约有 2700 个拷贝, 分子质量为 5.2 kD, 由 50 个氨基酸组成。其 C 端埋藏在核心, N 端暴露在噬菌体颗粒表面。外源蛋白片段可与 p8 蛋白的 N 端融合展示, 拷贝数可达到 2700 个, 但是 p8 蛋白不能与多于 6~8 个氨基酸的多肽融合, 较长的多肽融合会影响噬菌体本身的包装及感染性。p8 展示系统可用于筛选亲和力较低的配体<sup>[17]</sup>。

## 4 噬菌体展示肽库的筛选

噬菌体肽库的筛选一般采用生物筛选技术(biopanning), 又称为生物淘洗, 即从噬菌体随机肽库中筛选出所需的噬菌体展示多肽的过程。目前, 靶分子通常为纯化的抗体、受体、多肽或酶等。根据靶分子所处状态不同, 可将筛选方法分为固相筛选法<sup>[18,19]</sup>、液相筛选法<sup>[20]</sup>、全细胞筛选法<sup>[21]</sup>和体内筛选法<sup>[22]</sup>等。

固相筛选法和液相筛选法是最常用的筛选方法, 两者的主要区别在靶分子的固定化。固相筛选和标准的酶联

免疫吸附法(ELISA)类似, 直接将靶分子包被到酶标板。该方法操作简单, 筛选出阳性克隆的几率高, 但需要纯化大量的靶蛋白纯品。液相筛选法将靶分子用生物素标记后在液相中利用链亲和素磁珠借助磁场的作用进行多肽噬菌体筛选。其优点是增加了噬菌体颗粒与靶分子接触的几率, 提高了筛选效率, 但是液相筛选获得的克隆特异性较差。固相筛选和液相筛选的过程都由“吸附—洗脱—扩增”三个部分组成, 一般经过 3~5 轮的“吸附—洗脱—扩增”筛选, 含有特异性多肽的噬菌体即得到高度富集。

在筛选农药等小分子模拟表位中, 为了使筛选到的模拟表位可以用于建立较高敏感性的免疫分析方法, 通常采用梯度浓度的分析物进行洗脱。在第一轮淘选中使用较高浓度的分析物进行洗脱, 使第一轮筛选得到较多的克隆, 这样可以保证后几轮的筛选所投入的噬菌体含有较多种类的肽序列。后几轮淘选中用于洗脱的分析物浓度逐渐降低, 以便获得的多肽可以用于建立高敏感性竞争模式的免疫分析方法。在筛选抗农药等小分子免疫复合体多肽时, 为了使筛选到的多肽具有较高的亲和性, 通常采用梯度浓度靶分子的方法。在第一轮淘选中加入高浓度的靶分子, 延长靶分子与噬菌体作用时间, 筛选得到较多的克隆。后几轮的目的主要是富集亲和性高的多肽, 可以通过梯度降低靶分子浓度来达到此目的。

## 5 噬菌体展示肽库在农药等小分子化合物免疫分析中的应用

随着噬菌体展示肽库技术的不断改进和完善, 其在生命科学的众多领域得到了广泛应用。在农药等小分子免疫分析中的应用主要表现在模拟表位筛选、抗免疫复合体筛选及基于噬菌体展示多肽的特点建立的新免疫分析方法。

### 5.1 模拟表位筛选

利用抗体对噬菌体展示随机多肽库进行生物淘选, 可筛选出能够与抗体结合的噬菌体展示多肽。由于筛选出的多肽连接在噬菌体外壳蛋白上, 并且抗 M13 噬菌体的二抗已商品化, 所以筛选出的噬菌体展示多肽不需要与蛋白、酶或荧光物等连接, 可直接用作竞争物建立异源竞争免疫分析。目前, 已有研究者成功地从噬菌体展示多肽库中淘选出能够用作小分子化合物竞争物的噬菌体展示多肽<sup>[23-25]</sup>。但是, 该技术在农药及农药代谢物上的研究较少, Cardozo 等<sup>[26]</sup>筛选了除草剂阿特拉津(Atrazine)和草灭达(Molinate)的模拟表位。Kim 等<sup>[27]</sup>筛选了拟除虫菊酯类杀虫剂的两种代谢物的模拟表位, 研究结果显示利用噬菌体展示模拟表位建立的异源 ELISA 的敏感性比同源 ELISA 提高了 100 倍; Hua 等<sup>[28]</sup>筛选了有机磷农药的模拟表位, 研究显示噬菌体 ELSIA 的敏感性比化学合成异源 ELSIA 提高了 1 倍。这些研究结果说明噬菌体展示多肽模拟表位在建立异源免疫分析时具有很高的应用价值。与

化学合成竞争物相比, 从噬菌体展示随机多肽库中淘选模拟表位具有操作简单和易于建立高敏感性免疫分析方法的特点。同时, 噬菌体展示模拟表位还具有无毒、容易大量制备和纯化的优点, 该优点在生物毒素模拟表位研究上显得更有价值<sup>[29-31]</sup>。

在之前的研究中, 研究者们也对所获得的噬菌体展示多肽的序列进行了分析, 如 Kim 等<sup>[27]</sup>从环形 8 肽噬菌体展示库中淘选获得了 7 种不同序列的拟除虫菊酯类杀虫剂代谢物 t-DCCA(t-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylic acid)的模拟表位, 其中 3 种具有 SWLXXFXX (X 为随机氨基酸)序列特征, 其他四种为随机序列。Hua 等<sup>[28]</sup>从环形 8 肽噬菌体展示库中淘选获得了 4 种不同序列的有机磷类农药的模拟表位, 都含有 PWPXRP(X 为随机氨基酸)序列特征。利用不同序列模拟表位建立的竞争免疫分析的敏感性存在差异, 证明噬菌体展示多肽模拟表位序列中含有核心氨基酸, 非核心氨基酸能够影响分析方法的敏感性。但是, 只从序列比对上对噬菌体展示多肽进行研究, 不能够为多肽的结构优化提供指导, 从而也限制了噬菌体展示肽库技术在农药等小分子免疫分析中的应用。农药等小分子模拟表位的研究报道总结见表 1。

### 5.2 抗免疫复合体筛选

非竞争分析模式一般需要抗原含有两个或两个以上不重叠抗原决定簇, 但是绝大多数农药与抗体结合之后都会被抗体的结合位点包裹起来, 不能被第二种抗体所识别, 因此无法建立非竞争分析模式。但是, 也有研究者们利用一些新颖的技术或手段建立了小分子化合物的非竞争免疫分析, 并且显示非竞争性免疫分析具有更好的敏感性和特异性。所采用的方法有制备抗免疫复合体抗体<sup>[39,40]</sup>、开放夹心分析法(open sandwich assay)<sup>[41,42]</sup>和筛选抗免疫复合体噬菌体展示多肽<sup>[43,44]</sup>。随着噬菌体展示技术的发展, 筛选抗免疫复合体噬菌体展示多肽的方法将会越来越多的运用于小分子非竞争免疫分析中。

利用抗体抗原结合物对噬菌体展示随机多肽库进行生物淘选, 可筛选出能够与抗原抗体结合物特异性结合的噬菌体展示多肽, 可用于建立非竞争免疫分析方法。如 González-Techera 等<sup>[10]</sup>利用抗原抗体复合物筛选噬菌体展示多肽库的策略, 获得了抗体阿特拉津和草灭达两种免疫复合体的噬菌体展示多肽, 研究结果显示敏感性提高了一个数量级以上, 对一些类似物的交叉反应显著降低; Inaba 等<sup>[45]</sup>用赤霉素(gibberellins)抗体抗原复合物在噬菌体库中筛选出了能够特异性抗赤霉素免疫复合体的噬菌体, 并建立了赤霉素的非竞争免疫分析方法, 分析结果表明该方法的敏感性要好于竞争分析; Kim 等<sup>[44]</sup>利用溴化二苯醚(brominated diphenyl ether)多克隆抗体抗原复合物在噬菌体库中筛选到了特异性抗溴化二苯醚免疫复合体的噬菌体, 并建立了间接非竞争酶联免疫分析, 其敏感性要高于同源

间接竞争酶联免疫分析 1400 倍; Dong 等<sup>[46]</sup>筛选获得了能够与孔雀绿抗原抗体复合物结合的噬菌体展示多肽, 建立的非竞争 ELISA 比竞争 ELISA 的敏感性提高了 16 倍。虽然非竞争分析模式具有优势, 但是该技术还处于研发初期

阶段, 在建立该分析方法中存在的最大挑战是抗免疫复合体多肽的筛选。如果能够提高抗免疫复合体多肽筛选的成功率, 将会大大促进农药等小分子化合物非竞争免疫分析的发展。农药等小分子抗免疫复合体的研究报道总结见表 2。

表 1 农药与其他小分子模拟表位噬菌体展示多肽  
Table 1 Phage-borne peptidomimetics of pesticides and other small molecules

靶标物名称	载体与展示系统	肽库	多肽序列	分析方法	参考文献	
阿特拉津	M13, P3	Ph.D.-8	LSWDWLGR*	ELISA	[26]	
		Ph.D.-C8C**	GAPERLSY*	ELISA		
	pAFF2, P3	Ph.D.-C9C	MGALRWLPN*	ELISA		
		Ph.D.-C10C	WHVGFWNERL*	ELISA		
		Ph.D.-C12C	RVDHLIWDPLGR*	ELISA		
草灭达	p8V2, P8	Ph.D.-11	RVPRECMSILI*	ELISA	[32,33]	
	pAFF/mBAP, P3	Ph.D.-C8C	KGLHMWFN*	ELISA, electrochemical immunosensor		
		Ph.D.-C8C	SSMGQWAK*	ELISA		
	pAFF2, P3	Ph.D.-C9C	DSSLWFTWE	ELISA		
		Ph.D.-C10C	WEGDMWLNH	ELISA		
拟除虫菊酯代谢物 DCCA-glycine	p8V2, P8	Ph.D.-11	HPWEDRQSAFL*	ELISA	[26]	
		pAFF/MBP, P3	Ph.D.-C8C	SWLNHFID*		ELISA
			Ph.D.-C8C	TYVWGPLW*		ELISA, real-time PCR, chemiluminescence ELISA, quantitative PrPCR
拟除虫菊酯代谢物 3-PBA	pAFF/MBP, P3	Ph.D.-7	WNNWQPQ	ELISA	[27]	
		Ph.D.-C7C	WNNWQPQ	ELISA		
四溴联苯醚	M13KE, P3	Ph.D.-12	GVSrKEILRAQG*	ELISA	[34]	
		Ph.D.-C8C	SPPWPPRP*	ELISA, immuno-loop-mediated isothermal amplification assay		
有机磷类农药	M13KE, P3	Ph.D.-C8C	SPPWPPRP*	ELISA, immuno-loop-mediated isothermal amplification assay	[28,35]	
玉米烯酮	M13KE, P3	Ph.D.-7	DAVILLM*	ELISA	[36]	
		Ph.D.-14, Cys-4	ANTWCYVDECMRIA*	ELISA		
黄曲霉毒素 B1	M13, P8	Ph.D.-16, Cys-6	EGTICPMDIKGCNQTP*	ELISA	[24]	
		M13KE, P3	Ph.D.-7	HPSDPRH*		ELISA
黄曲霉毒素混合物	M13KE, P3	Ph.D.-C8C	YPHPWNPT*	ELISA	[37]	
脱氧雪腐酶镰刀菌 烯醇	M13KE, P3	Ph.D.-7	SWGPFPP*	ELISA	[31]	
赭曲霉毒素 A	M13KE, P3	Ph.D.-7	IRPMVDP*	ELISA	[38]	
					[25]	

注: \*: 多肽序列未全部列出。

\*\* : 表示环状噬菌体展示多肽库, 即多肽序列两端各含有由一个半胱氨酸, 并形成二硫键。

表 2 农药与其他小分子抗免疫复合噬菌体展示体多肽  
Table 2 Anti-immunocomplex phage-borne peptide of pesticides and other small molecules

靶标物名称	载体与展示系统	肽库	多肽序列	分析方法	参考文献
阿特拉津	p8V2, P8	Ph.D.-C8C**	TPVRFWDM*	ELISA, dipstick,	[10]
		Ph.D.-C7C	RSHWDTW	ELISA	[10]
草灭达	p8V2, P8	Ph.D.-C8C	STWDTTGW*	ELISA, dipstick, real-time PCR	[10,47]
		Ph.D.-C8C	LEAPNIEG*	ELISA	[48]
拟除虫菊酯代谢物 3-PBA	pAFF/MBP, P3	Ph.D.-C8C	FNGKDWLY	ELISA, dipstick, magnetic bead-based ELISA, real-time PCR	[43,47,49]
溴化二苯醚	p8V2, P8	Ph.D.-C8C	FGRDTIFEV	ELISA	[44]
		Ph.D.-C9C	VHRDTIYFY*	ELISA, dipstick	
		Ph.D.-7	VKLNDLR	ELISA	
四溴联苯醚	M13KE, P3	Ph.D.-C7C	QELVRHL*	ELISA	[34]
		Ph.D.-12	WSEYDIPTQP	ELISA	
赤霉素	M13KE, P3	Ph.D.-12	ITIPLYALRSTA*	ELISA	[45]
孔雀绿	M13KE, P3	Ph.D.-C8C	LNHEFHLLH*	ELISA	[46]

注: \*: 多肽序列未全部列出。

\*\* : 表示环状噬菌体展示多肽库, 即多肽序列两端各含有由一个半胱氨酸, 并形成二硫键。

### 5.3 新免疫分析方法

ELISA 是免疫分析中最常用、有效的一种分析方法, 大部分研究者在噬菌体展示肽库筛选目的片段后都建立了 ELISA, 但是有一些研究者在获得目的片段后还尝试了一些新的分析方法。如 Kim 等<sup>[44]</sup>从环状 9 肽库中筛选得到抗四溴联苯醚(BDE-47)免疫复合体的多肽, 在建立 ELISA 的基础上还建立了纤维素试纸分析(dipstick assay)方法。研究结果显示, 纤维素试纸分析的敏感性要低于 ELISA, 但是检测时间要少于 ELISA。该方法适合少数样品的定性分析。一些研究者利用噬菌体展示多肽含有核酸的特点, 以核酸序列为信号标记物建立了免疫分析方法。如 Kim 等<sup>[47]</sup>利用噬菌体展示多肽建立了检测 3-苯氧基苯甲酸(3-PBA)的免疫 PCR 分析方法(immuno polymerase chain reaction); Hua 等<sup>[35]</sup>利用噬菌体展示多肽建立了检测有机磷农药的免疫环等温扩增分析方法(immuno loop-mediated isothermal amplification assay)。基于农药等小分子模拟表位和抗免疫复合体建立的分析方法总结见表 1 和表 2。利用噬菌体展示多肽的生物结构特点研发新的分析方法是噬菌体展示模拟表位和抗免疫复合体的优势之一, 也是农药等小分子化合物免疫分析的研究热点之一。

## 6 前景展望

噬菌体展示肽库技术凭借自身的独有优势和特点, 在农药等小分子免疫分析中的前景是不可限量的。借助噬

菌体展示肽库技术, 使获得模拟表位和抗免疫复合体具有一定的可操作性, 丰富了农药等小分子免疫分析的分析模式和分析方法。但作为一个不断完善、更新的新技术, 噬菌体展示肽库技术也存在一定的局限性。例如大肠杆菌的转化效率限制噬菌体展示随机肽库的库容量; 如何更快更好的从噬菌体展示肽库中淘选所需要的多肽。目前研究者正通过构建新的表达体系和新的淘选方法等措施来克服现有的缺陷。

### 参考文献

- [1] Marín JM, Gracia-Lor E, Sancho JV, *et al.* Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 1410–1420.
- [2] Cazorla-Reyes R, Fernández-Moreno JL, Romero-González R, *et al.* Single solid phase extraction method for the simultaneous analysis of polar and non-polar pesticides in urine samples by gas chromatography and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2011, 85: 183–196.
- [3] Lozano A, Rajski L, Belmonte-Valles N, *et al.* Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1268: 109–122.
- [4] Kwon H, Lehotay SJ, Geis-Asteggiane L. Variability of matrix effects in liquid and gas chromatography–mass spectrometry analysis of pesticide residues after QuEChERS sample preparation of different food crops [J]. *J*

- Chromatogr A, 2012, 1270: 235–245.
- [5] Morozova VS, Levashova AI, Ermin SA. Determination of pesticides by enzyme immunoassay [J]. *J Anal Chem*, 2005, 60: 202–217.
- [6] Hua XD, Yang JF, Wang LM, *et al.* Development of an enzyme linked immunosorbent assay and an immunochromatographic assay for detection of organophosphorus pesticides in different agricultural products [J]. *PLoS one*, 2012, 7: e53099.
- [7] Li PW, Zhang Q, Zhang W. Immunoassays for aflatoxins [J]. *Trend Anal Chem*, 2009, 28: 9.
- [8] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228: 1315–1317.
- [9] Menendez A, Scott JK. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies [J]. *Anal Biochem*, 2005, 336: 145–157.
- [10] González-Techera A, Vanrell L, Last JA, *et al.* Phage anti-Immune complex assay: general strategy for noncompetitive immunodetection of small molecules [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 7799–7806
- [11] Goldman ER, Pazirandeh MP, Charles PT, *et al.* Selection of phage displayed peptides for the detection of 2,4,6-trinitrotoluene in seawater [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 457: 13–19.
- [12] Kim YG, Lee CS, Chung WJ, *et al.* Screening of LPS-specific peptides from a phage display library using epoxy beads [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 329: 312–317.
- [13] Dufner P, Jermutus L, Minter RR. Harnessing phage and ribosome display for antibody optimization [J]. *Trend Biotechnol*, 2006, 24: 523–529.
- [14] Kim HJ, McCoy MR, Majkova Z, *et al.* Isolation of alpaca antihapten heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay [J]. *Anal Chem*, 2012, 84: 1165–1171.
- [15] Riechmann L, Holliger P. The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli* [J]. *Cell*, 1997, 90(2): 351–360.
- [16] Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE. Making antibodies by phage display technology [J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 433–455
- [17] Sidhu SS, Weiss GA, Wells JA, *et al.* High copy display of large proteins on phage for functional selections [J]. *Mol Biol*, 2000, 296(2): 487–495
- [18] Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, *et al.* Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display [J]. *J Mol Biol*, 2002, 315(5): 1087–1097.
- [19] Yu HQ, Dong XY, Su NY. An alternating elution strategy for screening high affinity peptides from a phage display peptide library [J]. *Biochem Eng*, 2004, 18(3): 169–175.
- [20] Griffiths AD, Williams SC, Hartly O, *et al.* Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J]. *EMBO J*, 1994, 13(14): 3 245–3 260
- [21] Lou J, Marzari R, Verzillo V, *et al.* Antibodies in haystacks: how selections strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries [J]. *J Immun Method*, 2001, 253(1-2): 233–242.
- [22] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries [J]. *Nature*, 1996, 380: 364–366.
- [23] Ball WJr, Wang Z, Malik B, *et al.* Selection of peptidic mimics of digoxin from phage-displayed peptide libraries by anti-digoxin antibodies [J]. *J Mol Biol*, 2000, 301: 101–115.
- [24] Thirumala-Devi K, Miller JS, Reddy G, *et al.* Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 in serological reactivity [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90: 330–336.
- [25] Liu RR, Yu Z, He QH, *et al.* An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin [J]. *Food Control*, 2007, 18: 872–877.
- [26] Cardozo S, González-Techera A, Last JA, *et al.* Analyte peptidomimetics selected from phage display peptide libraries: a systematic strategy for the development of environmental immunoassays [J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39: 4234–4241.
- [27] Kim HJ, González-techera A, González-sapienza GG, *et al.* Phage-borne peptidomimetics accelerate the development of polyclonal antibody-based heterologous immunoassays for the detection of pesticide metabolites [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 2047–2053.
- [28] Hua XD, Liu XF, Shi HY, *et al.* Development of a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus pesticides with phage-borne peptide [J]. *RSC Adv*, 2014, 4: 42445–42453.
- [29] Thirumala-Devi K, Miller JS, Reddy G, *et al.* Phage-displayed peptides that mimic aflatoxin B1 [J]. *J Appl Microbiol*, 2001, 90: 330–336.
- [30] Liu RR, Yu Z, He QH, *et al.* An immunoassay for ochratoxin A without the mycotoxin [J]. *Food Control*, 2007, 18: 872–877.
- [31] Wang YR, Wang H, Li PW, *et al.* Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 2426–2433.
- [32] González-Techera A, Umpiérrez-Failache M, Cardozo S, *et al.* High-throughput method for ranking the affinity of peptide ligands selected from phage display libraries [J]. *Bioconjug Chem*, 2008, 19(5): 993–1000.
- [33] Arévalo FJ, González-Techera A, Zon MA, *et al.* Ultra-sensitive electrochemical immunosensor using analyte peptidomimetics selected from phage display peptide libraries [J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 32: 231–237.
- [34] Wang J, Liu ZP, Li GQ, *et al.* Simultaneous development of both competitive and noncompetitive immunoassays for 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether using phaged is played peptides [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 9579–9583.
- [35] Hua XD, Yin W, Shi HY, *et al.* Development of phage immuno-loop - mediated isothermal amplification assays for organophosphorus pesticides in agroproducts [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 8441–8447.
- [36] He QH, Xu Y, Huang YH, *et al.* Phage-displayed peptides that mimic zearalenone and its application in immunoassay [J]. *Food Chem*, 2011, 126: 1312–1315.
- [37] Liu RR, Xu L, Qiu XM, *et al.* An immunoassay for determining aflatoxin B<sub>1</sub> using a recombinant phage as a nontoxic coating conjugate [J]. *J Food Saf*, 2012, 32: 318–325.
- [38] Yuan QP, Pestka JJ, Hespeneide BM, *et al.* Identification of mimotope peptides which bind to the mycotoxin deoxynivalenol-specific monoclonal antibody [J]. *Appl Environ Microb*, 1999, 65: 3279–3286.
- [39] Ullman EF, Milburn G, Jelesko J, *et al.* Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 1184–1189.
- [40] Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, *et al.* A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody [J]. *Nat Toxin*, 1999, 7: 49–55.
- [41] Suzuki C, Ueda H, Mahoney W, *et al.* Open sandwich enzyme-linked

- immunosorbent assay for the quantitation of small haptens [J]. *Anal Biochem*, 2000, 286: 238–246.
- [42] Ueda H, Yokozeki T, Arai R, *et al.* An optimized homogeneous noncompetitive immunoassay based on the antigen-driven enzymatic complementation [J]. *J Immunol Method*, 2003, 279: 209–218.
- [43] Kim HJ, Ahn KC, González-Techera A, *et al.* Magnetic bead-based phage anti-immunocomplex assay (PHAIA) for the detection of the urinary biomarker 3-phenoxybenzoic acid to assess human exposure to pyrethroid insecticides [J]. *Anal Biochem*, 2009, 386: 45–52.
- [44] Kim HJ, Rossotti MA, Ahn KC, *et al.* Development of a noncompetitive phage anti-immunocomplex assay for brominated diphenyl ether 47 [J]. *Anal Biochem*, 2010, 401: 38–46.
- [45] Inaba J, Nakamura S, Shimizu K, *et al.* Anti-metatype peptides, a molecular tool with high sensitivity and specificity to monitor small ligands [J]. *Anal Biochem*, 2009, 388: 63–70.
- [46] Dong JX, Xu C, Wang H, *et al.* Enhanced sensitive immunoassay: noncompetitive phage anti-immunocomplex assay for the determination of malachite green and leucomalachite green [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 8752–8758.
- [47] Kim HJ, McCoy M, Gee SJ, *et al.* Noncompetitive phage anti-immunocomplex real-time polymerase chain reaction for sensitive detection of small molecules [J]. *Anal Chem*, 2011, 83: 246–253.
- [48] Rossotti MA, Carlomagno M, González-Techera A, *et al.* Phage anti-immunocomplex assay for clomazone: two-site recognition increasing assay specificity and facilitating adaptation into an on-site format [J]. *Anal Chem*, 2010, 82: 8838–8843.
- [49] González-Techera A, Kim HJ, Gee SJ, *et al.* Polyclonal antibody-based noncompetitive immunoassay for small analytes developed with short peptide loops isolated from phage libraries [J]. *Anal Chem*, 2007, 79: 9191–9196.

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



华修德, 博士, 讲师, 主要研究方向为农药残留免疫分析。

E-mail: huaxiude@njau.edu.cn



王鸣华, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为农药残留及环境毒理。

E-mail: wangmha@njau.edu.cn