

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240524002

# 功能化 M13 噬菌体在食品安全检测中的应用研究进展

马小勇, 余丽萍, 姜 颖, 熊 颖\*, 任佳丽

(林产可食资源安全与加工利用湖南省重点实验室, 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 长沙 410004)

**摘 要:** 食品中各类风险因子是威胁其安全性的主要因素, 构筑生物传感方法快速检测各类风险因子对保障食品安全至关重要。M13 噬菌体是一种特异性识别、浸染大肠杆菌的病毒, 与抗体、功能核酸、分子印记聚合物等识别元件相比, 噬菌体更易获得、性质稳定、耐受性强。通过基因或化学修饰对 M13 噬菌体进行功能化修饰, 赋予其生物识别和信号传输双重功能, 用以构筑各种生物传感器平台, 具有操作简单、检测时间短、特异性好以及灵敏度高优点, 在食品安全检测中具有重要的应用价值。因此, 本文综述了 M13 噬菌体的功能化方法, 介绍了功能化的 M13 噬菌体检测食品样品中各类风险因子(食源性致病微生物、真菌孢子、过敏原、真菌毒素、农药残留等)的最新研究进展(2019 年—至今), 并展望了以 M13 噬菌体为代表的功能化噬菌体应用在食品安全领域的发展趋势, 将为拓展 M13 噬菌体在食品安全领域的应用提供理论参考价值。

**关键词:** 食品安全检测; M13 噬菌体; 基因修饰; 化学修饰

## Research progress on the application of functionalized M13 phage in food safety detection

MA Xiao-Yong, YU Li-Ping, JIANG Ying, XIONG Ying\*, REN Jia-Li

(Hunan Key Laboratory of Forestry Edible Resources Safety and Processing, College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

**ABSTRACT:** Various risk factors in food pose significant threats to its safety. Developing biosensors for rapid detection of these risk factors is crucial to ensure food safety. Phage M13 is a virus that specifically recognizes and infects *Escherichia coli*. Compared to antibodies, functional nucleic acids, molecular imprinted polymers, and other recognition elements, phages are easier to obtain, naturally stable, and well tolerated. M13 phages can be functionalized through genetic or chemical modifications, providing them with dual functions of biometric recognition and signal transmission. These modified phages can be used to construct various biosensor platforms. Such platforms offer simple operation, short detection times, good specificity, and high sensitivity, making them valuable in food safety detection. This paper reviewed the functionalization methods of M13 bacteriophage and

**基金项目:** 湖南省教育厅科学研究项目优秀青年项目(22B0284)、国家自然科学基金青年项目(32302226)、湖南省科技创新计划重点研发项目(2024JK2157)

**Fund:** Supported by the Scientific Research Project of Hunan Education Department (22B0284), the National Natural Science Foundation of China (32302226), and the Hunan Province Science and Technology Innovation Plan Key Research and Development Project (2024JK2157)

**\*通信作者:** 熊颖, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测与质量控制。E-mail: yingxiong201468@163.com

**\*Corresponding author:** XIONG Ying, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, No.498, Shaoshan South Road, Tianxin District, Changsha 410004, China. E-mail: yingxiong201468@163.com

presented the latest research progress (from 2019 to the present) on using functionalized M13 phage to detect various risk factors, such as foodborne pathogenic microorganisms, fungal spores, allergens, mycotoxins, and pesticide residues, in food samples. The paper also discussed the development trends of functional phages, represented by M13 phage, in the field of food safety. This paper will provide theoretical reference for expanding the application of M13 phage in the field of food safety.

**KEY WORDS:** food safety detection; M13 phage; genetic modification; chemical modification

0 引 言

噬菌体是细菌和古菌的病毒，可以控制菌类生物的种类和数量，对生态环境和地球化学物质的循环以及人类的健康均具有重要的意义。噬菌体具有基因组较小、结构简单、易操纵的特点，因而具有优良的可编辑性，被广泛应用于生物技术领域。1985 年，乔治·史密斯首次将外源基因插入噬菌体基因组，使目的基因编码的多肽展示在噬菌体表面，创建了噬菌体展示技术<sup>[1]</sup>。利用噬菌体展示技术，可将具有识别功能的多肽或蛋白修饰在噬菌体表面。此外，可以利用噬菌体表面本身的化学基团进行功能化修饰。噬菌体展示技术的发展以及噬菌体表面具有的功能基团，为功能化噬菌体在食品安全检测领域的应用奠定了基础<sup>[2-4]</sup>。

在食品工业日益发展的今天，食品中的风险因子，如食源性致病微生物、真菌毒素、过敏原、农药残留等，仍然是威胁食品安全的主要因素。开发快速、高特异性、高灵敏的生物传感分析方法，对各种风险因子进行早期筛查与监控，是确保食品安全的重要手段<sup>[5-8]</sup>。构筑一种传感分析方法主要包括：样品处理、目标物识别、信号输出以及

信号检测 4 个步骤。其中，目标物识别以及信号输出分别制约生物传感分析方法的特异性和灵敏度。开发获得兼具特异性识别和信号放大传导功能的检测元件，对保证分析方法的特异性和灵敏度具有重要意义<sup>[9-10]</sup>。噬菌体表面积大，可负载大量信号分子；生物相容性好，能适应多种样本检测环境，通过噬菌体展示技术和利用其表面丰富的功能基团，对其进行多重功能化修饰，是制备上述检测元件的理想材料<sup>[11-12]</sup>。

在众多类的噬菌体中，M13 噬菌体基因组相对较小、外源肽展示多样、结构稳定，耐受严苛的检测条件、易于纯化，常被用于制备生物传感方法中的检测元件<sup>[13]</sup>。本文归纳总结了 M13 噬菌体的功能化方法，介绍了功能化的 M13 噬菌体检测食品样品中各类风险因子的最新研究进展(2019 年—至今)(见表 1)，如食源性致病菌<sup>[14]</sup>、生物毒素<sup>[15]</sup>、农药残留<sup>[16]</sup>、过敏原<sup>[17]</sup>等，并展望了以 M13 噬菌体为代表的功能化噬菌体在食品安全检测领域的发展趋势。本文通过综述功能化 M13 噬菌体在食品安全检测中的应用，以期拓展 M13 噬菌体在食品安全领域的应用提供理论参考价值。

表 1 功能化 M13 噬菌体在食品检测中的应用  
Table 1 Application of functionalized M13 phage in food detection

| 功能化方式 | 功能化位置        | 目标物              | 信号输出 | 检出限                    | 样品          | 参考文献 |
|-------|--------------|------------------|------|------------------------|-------------|------|
| 基因修饰  | P8 蛋白        | 三硝基甲苯            | 比色分析 | 40 pmol/L              | 空气          | [18] |
|       | 外壳蛋白 P8      | AFB <sub>1</sub> | 化学发光 | 0.006 ng/mL            | 玉米、大米和面粉    | [66] |
|       | P8 蛋白        | 百草枯(PQ)          | SERS | 0.1 μg/cm <sup>2</sup> | 苹果          | [19] |
|       | P8 蛋白        | 吡虫啉              | 化学发光 | 0.067 ng/mL            | 土壤和水稻       | [20] |
|       | P8 蛋白        | 鼠伤寒沙门氏菌          | 化学发光 | <10 CFU/mL             | 果汁、牛奶、蜂蜜和猪肉 | [40] |
| 化学修饰  | M13 噬菌体氨基酸残基 | 铬(三价)            | 光学分析 | 14 ng/mL               | 水           | [21] |
|       | 巯基丙酸         | OTA              | 荧光成像 | 5.39 pg/mL             | 玉米          | [65] |
|       | P8 蛋白        | ZEN              | 化学发光 | 4.3 pg/mL              | 玉米          | [22] |
|       | 3-巯基丙酸       | 大肠杆菌 K12         | 电化学法 | 14 CFU/mL              | 水           | [54] |
|       | P3 蛋白        | <i>S. aureus</i> | SERS | 10 CFU/mL              | 橙汁和纯牛奶      | [49] |
|       | M13 噬菌体羧基    | 大肠杆菌 K12         | 比色分析 | 45 CFU/mL              | 软饮料         | [23] |
|       | 衣壳蛋白巯基       | DON              | 免疫传感 | 13.67 pg/mL            | 玉米          | [64] |

## 1 M13 噬菌体的功能化

### 1.1 M13 噬菌体功能化的基础

内在基因上, M13 噬菌体基因组为单链环状的 DNA, 一共有 6407 个核苷酸, 相对于其他噬菌体的基因组, M13 噬菌体具有较小的基因组, 包含 11 个编码基因, 所含序列 90% 以上可编码蛋白质, 使其容易使用点突变、CRISPR/Cas 等技术进行基因改造。化学结构上, M13 噬菌体表面具有丰富的化学基团, 如氨基和羧基(分别为 8100 个和 10800 个), 为化学修饰提供了大量的反应位点。噬菌体具有 5 种结构蛋白 P3、P6、P7、P8、P9, 环绕着中间的基因组, 组装成长度约 880 nm, 直径约 6 nm, 表面积约为  $18700 \text{ nm}^2$  的螺旋状圆柱体。其中, P3 蛋白位于噬菌体的尾部, 拷贝数为 3~5 个, 适宜用于展示分子量较大的蛋白。P8 蛋白为主要衣壳蛋白, 约有 2700 个拷贝, 适用于展示不超过 20 个氨基酸的肽段。物理性能上, M13 噬菌体是较为柔性的病毒颗粒, 甚至可以首尾相接形成环状结构。P8 蛋白上正电性的 C 端与负电性基因组 DNA 紧密结合, 而亲水性带负电的 N 端暴露在外端, 使整个噬菌体颗粒具有较好的生物相容性<sup>[24]</sup>。此外, M13 噬菌体颗粒在非自然的溶液环境中具有较好的稳定性, 使其能适应一些严苛的检测体系。

总之, 由衣壳蛋白组成的具有物理化学活性的柔性纳米表面, 为 M13 噬菌体提供了丰富的功能基团和巨大的空间负载信号分子, 是制备以 M13 噬菌体为检测元件, 并构建生物传感方法的前提<sup>[25]</sup>。

### 1.2 M13 噬菌体功能化的方式

基于 M13 噬菌体的特性, 对其进行功能化修饰主要有基因修饰和化学修饰两种方式。基因修饰方法以噬菌体展示技术为基础, 将外源蛋白或多肽展示在 M13 噬菌体特定的衣壳蛋白上<sup>[26]</sup>。根据展示的载体不同可分为基于噬菌体展示和基于噬菌粒展示两种方式(如图 1 所示)。不同于 M13 本身的基因组, 噬菌体载体为双链的环状 DNA, 在基因改造后较易被纯化, 并转化至宿主细胞进行重组噬菌体生产<sup>[27]</sup>。噬菌体载体展示的方式, 克服了 M13 噬菌体本身的单链 DNA 难以被限制性核酸酶或 DNA 连接酶处理的缺点, 使 M13 的 DNA 可以通过常规的分子生物学手段进行编辑<sup>[28]</sup>。通常, 将负责识别功能的多肽被展示在 P3 蛋白上, 负责连接信标分子的多肽被展示在 P8 蛋白的 N 端, 最终制备成兼具识别功能和信号传导功能的噬菌体检测元件<sup>[29]</sup>。噬菌粒载体展示是由噬菌粒和辅助噬菌体组成的系统, 噬菌粒提供抗性基因、外源衣壳蛋白基因、M13 噬菌体和质粒复制起点基因, 而其他与感染、复制、包装和分泌相关的性能都由辅助噬菌体提供。噬菌粒载体可以展示较大的蛋白(DNA 片段大于 10 kb), 但在重组 M13 噬菌体组装的过程中, 重组 P8 蛋白会和野生型 M13 噬菌体的 P8 蛋白竞

争, 导致大部分子代噬菌体缺失融合的衣壳蛋白, 重组 M13 噬菌体的得率较低, 因而在实际中应用较少。

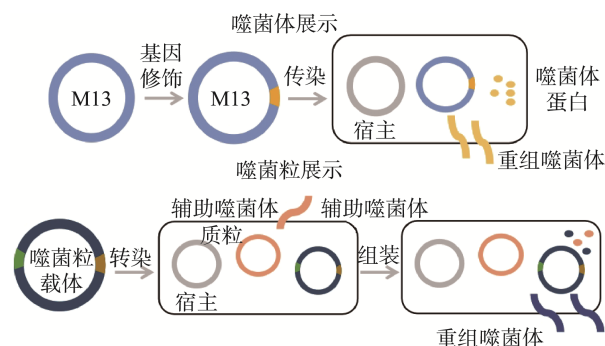
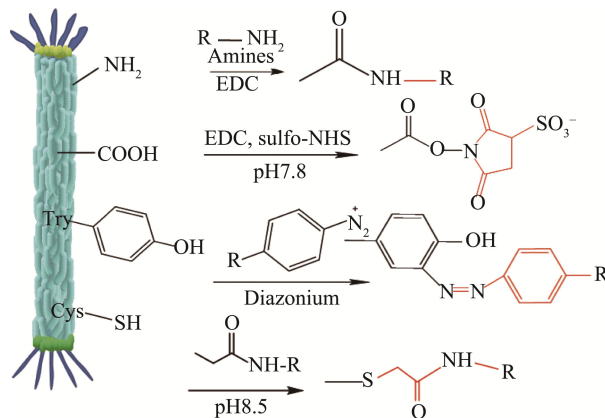


图1 M13噬菌体基因修饰方法

Fig.1 Gene modification strategy of M13 phage

化学修饰建立在 M13 噬菌体表面富含氨基酸残基的基础上。在对 M13 噬菌体表面氨基酸残基进行功能化修饰时, 要考虑反应条件是否温和, 以免破坏噬菌体的结构。M13 噬菌体表面含有的丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、酪氨酸等均可被用作目标残基进行化学偶联(如图 2 所示)。其中, P8 蛋白上赖氨酸和丙氨酸含有的氨基(每个噬菌体约有 8100 个)是使用最广泛的残基之一, 在弱碱性(pH 7.2~9)条件下, 通过酰胺反应可与含有羧基的物质进行偶联<sup>[30]</sup>。同样, P8 蛋白中谷氨酸和天冬氨酸侧链上的羧基(每个噬菌体约有 10800 个)也可通过酰胺反应, 与带有氨基的物质形成稳定的化学键而被功能化<sup>[31]</sup>。除了利用最多的氨基和羧基, P8 蛋白中酪氨酸上的苯酚基可以通过点击化学与偶氮化合物反应被功能化。此外, 也可以结合噬菌体展示技术, 为噬菌体创造更多的化学偶联位点。如半胱氨酸只存在于 M13 噬菌体的次要衣壳蛋白上, 以形成双硫键来稳定蛋白结构, 通过噬菌体展示, 将半胱氨酸展示在 P8 蛋白上, 赋予 M13 噬菌体更多的烷基化位点<sup>[32]</sup>。通过基因或化学修饰的方法, M13 噬菌体可以和 DNA、抗



注: Amine: 胺类物质; EDC: 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺; Sulfo-NHS: N-羟基琥珀酰亚胺; Diazonium: 重氮化合物。

图2 M13噬菌体化学修饰方法

Fig.2 Chemistry modification strategy of M13 phage

体、纳米材料、荧光染料、量子点、药物等偶联从而被功能化,并进一步应用在生物传感<sup>[33-34]</sup>、生物医药<sup>[35]</sup>、环境<sup>[36]</sup>、能源<sup>[37-38]</sup>等领域。

## 2 M13 功能化噬菌体在食品安全检测中的应用

得益于噬菌体展示技术的发展,大量识别食品风险因子的抗体、多肽从噬菌体展示库中被筛出<sup>[39]</sup>。结合基因和化学修饰策略,这些噬菌体被进一步功能化,并以此构建了许多生物传感方法,应用于多种食品中风险因子的检测,这些风险因子主要包括食源性致病微生物<sup>[40-41]</sup>、真菌孢子<sup>[42]</sup>、过敏原<sup>[43-44]</sup>、生物毒素<sup>[45]</sup>、农药残留<sup>[46]</sup>等。

### 2.1 M13 功能化噬菌体在食源性致病微生物检测中的应用

食源性致病菌是引发食源性疾病的主要原因,造成了巨大的社会经济负担。因此,对食源性致病菌进行早期监控,是控制食源性疾病爆发的重要手段<sup>[47-49]</sup>。现有报道 M13 噬菌体的检测元件主要被开发应用于检测大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)<sup>[50]</sup>、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)<sup>[51]</sup>、沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)<sup>[40]</sup>、单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)<sup>[52]</sup>等食源性致病菌。

M13 噬菌体以带 F<sup>+</sup> 鞭毛的大肠杆菌为宿主菌,具有识别部分大肠杆菌的能力,利用这一特性,对其主要衣壳蛋白 P8 蛋白进行功能化修饰,就可以实现对部分大肠杆菌的检测。MENG 等<sup>[53]</sup>通过定点突变法将链霉亲和素结合肽(streptavidin binding peptide, SBP)的基因插入 M13 噬菌体 P8 蛋白的 N 端,制备了 SBP 功能化的噬菌体,并结合磁分离与链霉亲和素修饰的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP),构建了比色检测方法(如图 3 所示)。对溶液、牛奶、猪肉、生菜中的 *E. coli* CMCC 44102 进行检测,检出限分别为 4、4、4 和 3 CFU/mL。SEDKI 等<sup>[54]</sup>利用 M13 噬菌体表面的氨基与金电极上的巯基丙酸反应,构建了一种阻抗型电化学方法,对 *E. coli* XL1-Blue 进行检测,检出限为 14 CFU/mL。

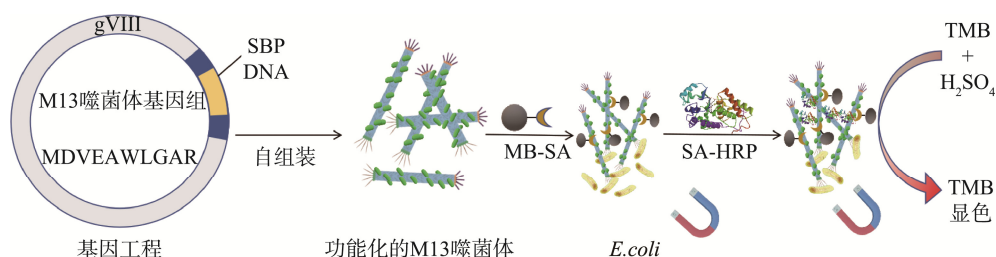
通过噬菌体展示技术,淘选识别食源性致病菌的抗体、多肽等,可以将功能化的 M13 噬菌体应用于其他细菌的检测中。WANG 等<sup>[51]</sup>从噬菌体展示库中淘选到识别金黄

色葡萄球菌的多肽,再利用携带该多肽的 M13 噬菌体上的还原性氨基酸,在碱性条件下还原氯金酸制备金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)功能化的 M13 噬菌体,构建了针对金黄色葡萄球菌的拉曼检测方法。在最优条件下,该方法对金黄色葡萄球菌的检测灵敏度为 10 CFU/mL。ZHANG 等<sup>[40]</sup>以表达的可溶性 Nb9 为捕获抗体,以 M13 噬菌体展示的 Nb1 为检测抗体,建立了基于化学发光的酶联免疫吸附法。在最佳条件下,该方法检测鼠伤寒沙门氏菌的检出限为 10 CFU/mL。KENZEL 等<sup>[52]</sup>从 12 肽库中筛选出特异性识别增李斯特菌的多肽(Inla),将其用于血液样本中的单增李斯特菌的检测。该携带识别增李斯特菌多肽的 M13 噬菌体,有望应用于食品样品中单增李斯特菌的检测。

此外,利用噬菌体丝状的结构和表面丰富的功能基团,将其组装成具有抑菌活性的微纳米材料,也是其功能化应用的关注点之一。TIAN 等<sup>[55]</sup>利用 M13 噬菌体表面的氨基和羧基,在交联剂戊二醛和牛血清蛋白的作用下,进行自组装反应,制备成蛋白和噬菌体的杂合凝胶。在合成过程中,牛血清蛋白上丰富的氨基和羧基可以消耗过多的交联剂,减少单个噬菌体内部的交联化,使噬菌体并排排列,负责识别和浸染细菌的 P3 蛋白端暴露在凝胶表面,最终使得噬菌体的抗菌性能得到最大程度地保留和利用。直接将噬菌体凝胶喷涂在食物上,可以减少食物上的大肠杆菌数量,并使食物保持无菌状态。

### 2.2 M13 功能化噬菌体在真菌孢子检测中的应用

真菌孢子是真菌繁殖和传播的主要生殖细胞,在适宜的水分活度下,可以附着在各类基质上生长,通过气流分散进入人体,对人体健康造成危害。食品基质较为适合真菌繁殖,因此对真菌孢子进行早期监控,对保障食品安全具有重要意义<sup>[35]</sup>。LEE 等<sup>[42]</sup>通过 M13 噬菌体展示库淘选到识别黑曲霉孢子的多肽,再通过活泼酯化法将携带该多肽噬菌体上的氨基与生物素上的羧基反应,制备成生物素功能化的噬菌体。在黑曲霉孢子存在的情况下,通过该噬菌体负载大量链霉亲和素修饰的 HRP 催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色,构建了比色型免疫分析方法。在最优条件下,该方法最低可以检测到 709 个黑曲霉孢子。



注: MDVEAWLGAR: 链霉亲和素结合肽基因序列; SBP: 链霉亲和素结合肽; MB-SA: 磁珠-链霉亲和素; SA-HRP: 链霉亲和素-辣根过氧化物酶; TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

图3 基于M13-SBP噬菌体检测大肠杆菌的原理

Fig.3 Detection principle of *E. coli* based on M13-SBP phage

### 2.3 M13 功能化噬菌体在过敏原检测中的应用

过敏原是能引发人体变态反应的一类物质, 其导致的临床症状较轻微如荨麻疹等, 严重则会危及生命。因此, 对食品中过敏原浓度进行检测和监控, 对保障特殊膳食人群的健康具有重要意义<sup>[56]</sup>。JIAO 等<sup>[57]</sup>前期筛选得到展示有识别甲壳类原肌球蛋白过敏原纳米抗体的噬菌体, 通过静电吸附作用将银包 AuNPs 负载在噬菌体表面, 赋予噬菌体拉曼信号和过氧化物酶催化活性。样品中存在的甲壳类原肌球蛋白与层析试纸条检测线上固定的甲壳类原肌球蛋白共同竞争结合噬菌体 P3 蛋白上的纳米抗体, 以此建立目标物浓度与比色信号以及拉曼信号的剂量关系, 最终构建了甲壳类原肌球蛋白双信号检测方法。在最优条件下, 该方法在比色和拉曼两种模式下的最低检出限分别为 0.0057  $\mu\text{g/mL}$  和 0.0026  $\mu\text{g/mL}$ 。

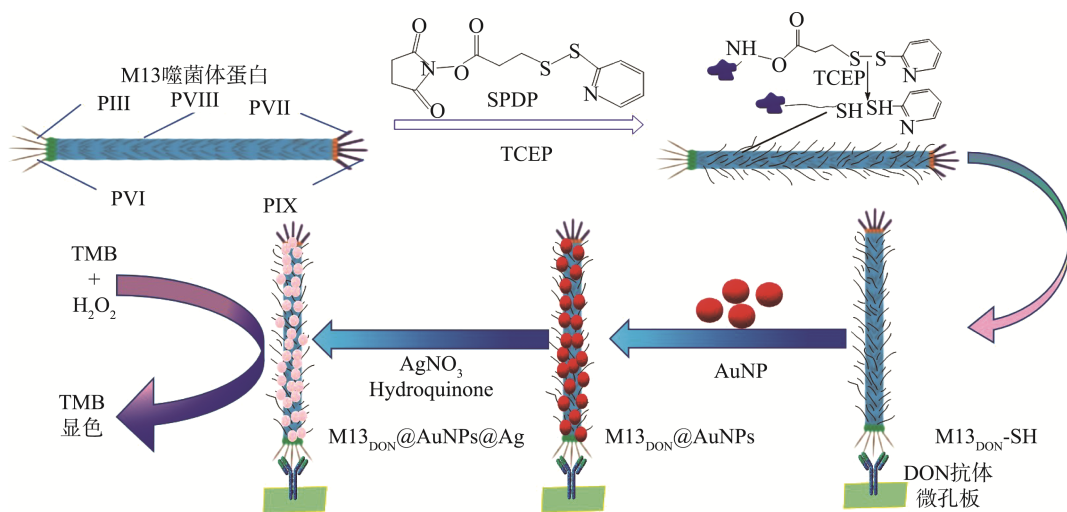
### 2.4 M13 功能化噬菌体在真菌毒素检测中的应用

真菌毒素是真菌产生的次生代谢产物, 对脊椎动物和其他生物具有较强的毒性作用, 主要污染谷物、咖啡豆、干果等经济作物, 因此对真菌毒素进行早期快速筛查, 对保障食品的质量和数量安全均具有重要意义<sup>[58-59]</sup>。已有报道显示, M13 噬菌体构建的生物传感方法, 主要被开发用于检测黄曲霉毒素(aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>)<sup>[60]</sup>、赭曲霉毒素(ochratoxin, OTA)<sup>[61]</sup>、玉米赤霉烯酮(zearelenone, ZEN)<sup>[62]</sup>、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)<sup>[63]</sup>等毒素。

在构筑真菌毒素的生物传感检测方法时, 常先用 M13 噬菌体展示库筛选模拟真菌毒素的多肽(模拟表位肽), 以避免在制备抗原过程中接触高浓度有毒的真菌毒素化合物以及使用大量的有机溶剂。在得到携带模拟表位肽的噬

菌体后, 再对噬菌体进一步功能化, 制备成双功能噬菌体, 并构建竞争型的免疫检测方法。FANG 等<sup>[64]</sup>利用前期筛选得到的 P3 蛋白端携带模拟 DON 多肽的噬菌体, 并通过氮-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)-酸酯与 M13 噬菌体上的氨基进行反应, 制备成巯基功能化的噬菌体做为纳米酶的容器(如图 4 所示)。在金硫键的作用下进一步负载 AuNPs, 并通过原位生长法包裹一层银, 最终赋予噬菌体过氧化物酶的活性, 催化 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色, 从而构建检测 DON 的比色方法。在最佳条件下, 该方法检测 DON 的灵敏度为 13.67  $\text{pg/mL}$ , 较传统的免疫学方法提高了近 1000 倍。TONG 等<sup>[65]</sup>在前期筛选得到的携带识别 OTA 多肽的噬菌体基础上, 利用活泼酯化的生物素与噬菌体上的氨基反应, 制备了生物素功能化的噬菌体。在链霉亲和素的介导下, 该功能化的噬菌体可以负载大量同样被生物素功能化的葡萄糖氧化酶, 催化产生双氧水, 淬灭双氧水敏感型量子点的荧光, 最终建立 OTA 的荧光检测法。在最优条件下, 该方法的灵敏度为 5.39  $\text{pg/mL}$ 。

为克服检测小分子的竞争型免疫分析方法灵敏度较低和线性范围较窄的缺点, 有研究采用 M13 噬菌体的肽库筛选可以识别目标物和其抗体形成的免疫复合物的多肽, 再利用筛选到的多肽构建针对小分子目标物的夹心免疫分析方法。ZOU 等<sup>[66]</sup>通过噬菌体展示技术, 筛选得到识别 AFB<sub>1</sub> 和其抗体复合物的多肽, 再利用活泼酯化的生物素与携带该多肽的 M13 噬菌体的氨基进行反应, 制备了生物素功能化的 M13 噬菌体。在 AFB<sub>1</sub> 存在的条件下, 形成抗体、目标物和噬菌体夹心复合物, 并通过链霉亲和素与生物素系统引入 HRP, 最终建立了化学发光方法对 AFB<sub>1</sub> 进行检测, 检测灵敏度为 6  $\text{pg/mL}$ , 线性范围为 19~407  $\text{pg/mL}$ 。



注: SPDP: N-琥珀酰亚胺3-(2-吡啶二硫代)丙酸; TCEP: 三(2-羧乙基)膦酸盐; AuNP: 金纳米银颗粒; Hydroquinone: 对苯二酚; TMB: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

图4 基于巯基功能化的M13噬菌体检测DON的原理

Fig.4 Principle of detecting DON using M13 bacteriophage based on thiol functionalization

## 2.5 M13 功能化噬菌体在农药残留检测中的应用

农药残留是农药施用于粮食、蔬菜、水果等农作物后残存的农药本体、有毒代谢物、降解物等的总称。通过食物进入人体后,会引起腹泻、脏器损伤甚至细胞癌变等症状,开发针对农药残留的高效检测方法是防止农药危害人类健康的重要策略<sup>[67-68]</sup>。SHI 等<sup>[69]</sup>用噬菌体展示技术筛选得到 O,O-二甲基有机磷农药的模拟表位肽,并以携带该模拟表位肽的噬菌体构建了检测 O,O-二甲基有机磷农药的电化学检测方法。在该方法中,模拟表位肽功能化的噬菌体和样品中的目标物竞争结合电极上的抗体,当目标物较少时,与抗体反应的噬菌体可以通过识别 M13 噬菌体的抗体介导负载大量的 HRP,催化产生电活性物质放大电化学信号。在最佳条件下,该方法对 9 种 O,O-二甲基有机磷农药的最低检出限范围为 0.003~0.014 ng/mL。

## 3 结束语

M13 噬菌体具有优良的生物、物理、化学性能,在生物医药、环境、食品安全领域发挥了重要的作用。本文综述了 M13 噬菌体的功能化方法和功能化 M13 噬菌体在食品安全检测中的应用。M13 噬菌体兼具识别和信号放大传导功能,在检测中可以缩短检测流程、提高检测方法的灵敏度,在实际检测中具有一定的应用前景。

虽然功能化的 M13 噬菌体在食品中风险因子检测应用取得了一定的进展,但是仍有一些不足之处,值得进一步研究,主要有以下几个方面:

(1)目前,通过噬菌体展示技术淘选到的识别各类风险因子的多肽和抗体种类仍然较少,具有特异性识别功能的 M13 噬菌体种类仍然有待开发丰富。此外,也需要改良和创新淘选方法,提高针对目标物的噬菌体淘选成功率。

(2)对承担信号载体与放大功能的 P8 蛋白进行基因改造时,展示较长的多肽会影响噬菌体组装,最终影响重组噬菌体的获得率。但目前对展示在 P8 上的多肽种类、长度、疏水性等参数并无清晰定论,仍需进一步解析清楚。

(3)噬菌体表面可以利用的官能基团种类有限,不利于实现噬菌体的定点功能化。为克服这一缺陷,可以采用基因密码子拓展技术,将非天然的氨基酸特异性地引入目标衣壳蛋白的指定位点,利用非天然氨基酸的特殊官能团赋予噬菌体新的物理化学性能,最终实现精准功能化。

## 参考文献

- JAROSZEWICZ W, MORCINEK-ORŁOWSKA J, PIERZYŃSKA K, *et al.* Phage display and other peptide display technologies [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2022, 46(2): fuab052.
- PLANO LM, FRANCO D, RIZZO MG, *et al.* M13 bacteriophages as bioreceptors in biosensor device [C]. *Sensors: Proceedings of the Fourth National Conference on Sensors, Catania, Italy*, 2019.
- 魏麟, 孙娟娟. 噬菌体作为新型食品抗菌剂的风险评估与风险规制[J].

食品与机械, 2020, 36(10): 12-17.

WEI L, SUN JJ. Risk assessment and regulation of bacteriophage as a new food antimicrobial agent [J]. *Food Mach*, 2020, 36(10): 12-17.

- 陈静, 祁露, 郑雅露, 等. 致病性弧菌及其噬菌体防治研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(24): 9288-9294.
- CHEN J, QI L, ZHENG YL, *et al.* Review on pathogenic vibrio and its phage control [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(24): 9288-9294.
- LIANG M, LI Z, WANG W, *et al.* A CRISPR-Cas12a-derived biosensing platform for the highly sensitive detection of diverse small molecules [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3672.
- CHO CH, PARK TJ, PARK JP. Affinity peptide-based electrochemical biosensor for the highly sensitive detection of bovine rotavirus [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2022, 27(4): 607-614.
- 王吉, 李慧慧, 朱文娟, 等. 基于噬菌体的电化学生物传感器在检测食源性病原菌中的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(7): 254-262.
- WANG J, LI HH, ZHU WJ, *et al.* Progress in the development and application of bacteriophage-based electrochemical biosensors for detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. *Food Sci*, 2022, 43(7): 254-262.
- 王森, 沈飞, 何学明, 等. 生物传感器技术在大肠杆菌内毒素检测中的应用进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(13): 48-55.
- WANG S, SHEN F, HE XM, *et al.* Application of biosensors in the detection of *Escherichia coli* endotoxin [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(13): 48-55.
- FANG H, ZHOU Y, MA Y, *et al.* M13 bacteriophage-assisted recognition and signal spatiotemporal separation enabling ultrasensitive light scattering immunoassay [J]. *Acs Nano*, 2023, 17(18): 18596-18607.
- PARAMASIVAM K, SHEN Y, YUAN J, *et al.* Advances in the development of phage-based probes for detection of bio-species [J]. *Biosensors*, 2022, 12(1): 30.
- SHIN JH, YANG HJ, KIM JH, *et al.* Quantitative label-free determination of thrombin using a chemically-modified M13 virus-electrode interface [J]. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2023, 28(2): 235-245.
- CARMODY CM, GODDARD JM, NUGEN SR. Bacteriophage capsid modification by genetic and chemical methods [J]. *Bioconjug chem*, 2021, 32(3): 466-481.
- LEMIRE S, YEHL KM, LU TK. Phage-based applications in synthetic biology [J]. *Annual Rev Virol*, 2018, 5(1): 453-476.
- WANG J, KANACH A, HAN R, *et al.* Application of bacteriophage in rapid detection of *Escherichia coli* in foods [J]. *Curren Opin Food Sci*, 2021, 39: 43-50.
- WANG J, MUKHTAR H, MA L, *et al.* VHH antibodies: Reagents for mycotoxin detection in food products [J]. *Sensors*, 2018, 18(2): 485.
- YOU T, DING Y, CHEN H, *et al.* Development of competitive and noncompetitive immunoassays for clothianidin with high sensitivity and specificity using phage-displayed peptides [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 425: 128011.
- ZHOU F, HE S, SUN H, *et al.* Advances in epitope mapping technologies for food protein allergens: A review [J]. *Trend Food Sci Technol*, 2021, 107: 226-239.
- MOON JS, CHOI J, HWANG YH, *et al.* Liquid sensing of a M13 bacteriophage-based colorimetric sensor [J]. *Macromol Res*, 2018, 26(9): 775-779.

- [19] KOH EH, MUN C, KIM C, *et al.* M13 bacteriophage/silver nanowire surface-enhanced Raman scattering sensor for sensitive and selective pesticide detection [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2018, 10(12): 10388–10397.
- [20] DU M, YANG Q, LIU W, *et al.* Development of immunoassays with high sensitivity for detecting imidacloprid in environment and agro-products using phage-borne peptides [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 723: 137909.
- [21] YANG T, LI N, WANG X, *et al.* Dual functional AgNPs-M13 phage composite serves as antibacterial film and sensing probe for monitoring the corrosion of chromium-containing dental alloys [J]. *Chin Chem Lett*, 2020, 31(1): 145–149.
- [22] LIU R, SHI R, ZOU W, *et al.* Highly sensitive phage-magnetic-chemiluminescent enzyme immunoassay for determination of zearalenone [J]. *Food Chem*, 2020, 325: 126905.
- [23] NAKAMA K, SEDKI M, MULCHANDANI A. Label-free chemiresistor biosensor based on reduced graphene oxide and M13 bacteriophage for detection of coliforms [J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 1150: 338232.
- [24] TRIDGETT M, LLOYD JR, KENNEFICK J, *et al.* Mutation of M13 bacteriophage major coat protein for increased conjugation to exogenous compounds [J]. *Biocon Chem*, 2018, 29(6): 1872–1875.
- [25] 惠潇然, 黄振华, 刘静, 等. 噬菌体在食品微生物安全领域中应用的局限性和挑战[J]. *食品科学*, 2023, 44(13): 338–345.
- HUI XR, HUANG ZH, LIU J, *et al.* Limitations and challenges of the application of phages in the field of microbial food safety [J]. *Food Sci*, 2023, 44(13): 338–345.
- [26] TSEDEV U. Engineering M13 bacteriophage nanoplatfoms for diagnostic and therapeutic applications [D]. Cambridge: Massachusetts Institute of Technology, Department of Biological Engineering, 2021.
- [27] LENNEMAN BR, FERNBACH J, LOESSNER MJ, *et al.* Enhancing phage therapy through synthetic biology and genome engineering [J]. *Current Opinion Biotechnol*, 2021, 68: 151–159.
- [28] PASSARETTI P, KHAN I, DAFFORN TR, *et al.* Improvements in the production of purified M13 bacteriophage bio-nanoparticle [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18538.
- [29] TONG W, XIONG H, FANG H, *et al.* Bifunctional M13 phage as enzyme container for the reinforced colorimetric–photothermal dual-modal sensing of ochratoxin A [J]. *Toxins*, 2022, 15(1): 5.
- [30] CARMODY CM, GODDARD JM, NUGEN SR. Bacteriophage capsid modification by genetic and chemical methods [J]. *Biocon Chem*, 2021, 32(3): 466–481.
- [31] ALLEN GL, GRAHN AK, KOURENTZI K, *et al.* Expanding the chemical diversity of M13 bacteriophage [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 961093.
- [32] WANG R, LI HD, CAO Y, *et al.* M13 phage: A versatile building block for a highly specific analysis platform [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(18): 3927–3944.
- [33] XU P, GHOSH S, GUL AR, *et al.* Screening of specific binding peptides using phage-display techniques and their biosensing applications [J]. *TRAC Trend Anal Chem*, 2021, 137: 116229.
- [34] CHEN L, WU Y, LIN Y, *et al.* Virus-templated FRET platform for the rational design of ratiometric fluorescent nanosensors [J]. *Chem Commun*, 2015, 51(50): 10190–10193.
- [35] FADAIE M, DIANAT-MOGHADAM H, GHAFOURI E, *et al.* Unraveling the potential of M13 phages in biomedicine: Advancing drug nanodelivery and gene therapy [J]. *Environ Res*, 2023, 238: 117132.
- [36] SHARMA RS, KARMAKAR S, KUMAR P, *et al.* Application of filamentous phages in environment: A tectonic shift in the science and practice of ecorestoration [J]. *Ecol Evol*, 2019, 9(4): 2263–2304.
- [37] WINTON AJ, ALLEN MA. Rational design of a bifunctional peptide exhibiting lithium titanate oxide and carbon nanotube affinities for lithium-ion battery applications [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2023, 15(6): 8579–8589.
- [38] LIM C, KO J, JEON D, *et al.* Probing molecular mechanisms of M13 bacteriophage adhesion [J]. *Commun Chem*, 2019, 2(1): 96.
- [39] 蒋华伟, 蒋谨优, 张书龙, 等. 食品危害因子检测与安全风险预测研究进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(15): 360–373.
- JIANG HW, JIANG JY, ZHANG SL, *et al.* Research progress on the detection of food hazard factors and safety risk prediction [J]. *Food Sci*, 2024, 45(15): 360–373.
- [40] ZHANG C, LIU Z, BAI M, *et al.* An ultrasensitive sandwich chemiluminescent enzyme immunoassay based on phage-mediated double-nanobody for detection of *Salmonella typhimurium* in food [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2022, 352: 131058.
- [41] YE J, GUO J, LI T, *et al.* Phage-based technologies for highly sensitive luminescent detection of foodborne pathogens and microbial toxins: A review [J]. *Compr Rev Food Sci*, 2022, 21(2): 1843–1867.
- [42] LEE SM, LEE S, LEE SH, *et al.* Engineered M13 bacteriophage-enhanced colorimetric detection of allergenic fungi [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2023, 393: 134244.
- [43] ZHANG A, ZHAO H, PEI S, *et al.* Identification and structure of epitopes on cashew allergens Ana o 2 and Ana o 3 using phage display [J]. *Molecules*, 2023, 28(4): 1880.
- [44] JIAO S, XIE X, HE Z, *et al.* Lateral flow immunochromatographic assay for competitive detection of crustacean allergen tropomyosin using phage-displayed shark single-domain antibody [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(3): 1811–1821.
- [45] SUN W, ZHANG Y, JU Z. Mimotopes for mycotoxins diagnosis based on random peptides or recombinant antibodies from phage library [J]. *Molecules*, 2021, 26(24): 7652.
- [46] GUO D, CHEN J, ZHAO X, *et al.* Genetic and chemical engineering of phages for controlling multidrug-resistant bacteria [J]. *Antibiotics*, 2021, 10(2): 202.
- [47] ALIAKBAR AZ, HASHEMI A, PLANO LM, *et al.* Bacteriophage based biosensors: Trends, outcomes and challenges [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(3): 501.
- [48] VIDYADHARANI G, VIJAYA BHAVADHARANI HK, SATHISHNATH P, *et al.* Present and pioneer methods of early detection of food borne pathogens [J]. *J Food Sci Technol*, 2022, 59(6): 2087–2107.
- [49] 钟毓红, 吴佳琪, 潘小艳, 等. 基于核酸适配体的光学纳米传感器在食源性致病菌检测中的应用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(15): 101–112.
- ZHONG YH, WU JQ, PAN XY, *et al.* Application on aptamer-based optical nanosensors for detection of foodborne pathogens [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(15): 101–112.
- [50] HINKLEY T, GARING S, JAIN P, *et al.* A syringe-based biosensor to rapidly detect low levels of *Escherichia coli* (ECOR13) in drinking water using engineered bacteriophages [J]. *Sensors*, 2020, 20(7): 1953.

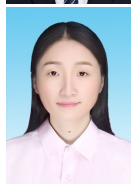
- [51] WANG XY, YANG JY, WANG YT, *et al.* M13 phage-based nanoprobe for SERS detection and inactivation of *Staphylococcus aureus* [J]. *Talanta*, 2021, 221: 121668.
- [52] KENZEL J, BRÜGGEMANN DA, FUNKE SA. Selection of *Listeria monocytogenes* inla-binding peptides using phage display-novel compounds for diagnostic applications? [J]. *Appl Microbiol*, 2022, 2(4): 921–933.
- [53] MENG M, JIANG Y, LI W, *et al.* Bio-modification of M13 bacteriophage as signal amplification container for the highly sensitive detection of live *E. coli* [J]. *Microchem J*, 2023, 195: 109492.
- [54] SEDKI M, CHEN X, CHEN C, *et al.* Non-lytic M13 phage-based highly sensitive impedimetric cytosensor for detection of coliforms [J]. *Biosens Bioelectr*, 2020, 148: 111794.
- [55] TIAN L, HE L, JACKSON K, *et al.* Self-assembling nanofibrous bacteriophage microgels as sprayable antimicrobials targeting multidrug-resistant bacteria [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7158.
- [56] LOPES JP, SICHERER S. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and treatment [J]. *Curr Opin Immunol*, 2020, 66: 57–64.
- [57] JIAO S, XIE X, HE Z, *et al.* Lateral flow immunochromatographic assay for competitive detection of crustacean allergen tropomyosin using phage-displayed shark single-domain antibody [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(3): 1811–1821.
- [58] MALIR F, PICKOVA D, TOMAN J, *et al.* Hazard characterisation for significant mycotoxins in food [J]. *Mycotoxin Res*, 2023, 39(2): 81–93.
- [59] 王俊豪, 朱效东, 王玉坤, 等. 基于纳米材料的适配体生物传感器检测真菌毒素研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(23): 59–69.
- WANG JH, ZHU XD, WANG YK, *et al.* Advances in aptamer-based biosensor based on nanomaterials for detecting mycotoxins [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(23): 59–69.
- [60] WANG Y, WANG H, LI P, *et al.* Phage-displayed peptide that mimics aflatoxins and its application in immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(10): 2426–2433.
- [61] ZHAN S, FANG H, CHEN Q, *et al.* M13 bacteriophage as biometric component for orderly assembly of dynamic light scattering immunosensor [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 217: 114693.
- [62] ZHOU J, LI Y, LIU Z, *et al.* Induction of anti-zearalenone immune response with mimotopes identified from a phage display peptide library [J]. *Toxicon*, 2021, 199: 1–6.
- [63] 江东健, 罗秀儿, 何庆华. 基于噬菌体展示纳米抗体的绿色免疫 PCR 检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 256–261.
- JIANG DJ, LUO XER, HE QH. Phage displayed nanobody mediated green immuno-PCR for detection of deoxynivalenol [J]. *Food Sci*, 2019, 40(8): 256–261.
- [64] FANG H, ZHAN S, FENG L, *et al.* Chemical modification of M13 bacteriophage as nanozyme container for dramatically enhanced sensitivity of colorimetric immunosensor [J]. *Sensor Actuat B-Chem*, 2021, 346: 130368.
- [65] TONG W, FANG H, XIONG H, *et al.* Eco-friendly fluorescent ELISA based on bifunctional phage for ultrasensitive detection of ochratoxin A in corn [J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2429.
- [66] ZOU W, SHI R, WANG G, *et al.* Rapid and sensitive noncompetitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 based on anti-immune complex peptide [J]. *Food Chem*, 2022, 393: 133317.
- [67] 华修德, 施海燕, 王鸣华. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(12): 3955–3961.
- HUA XD, SHI HY, WANG MH. Phage display peptide library technology and its research progress in immunoassay of pesticide residue [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(12): 3955–3961.
- [68] 窦博鑫, 张云亮, 王艳, 等. 生物传感器在食品检测领域的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(3): 845–851.
- DOU BX, ZHANG YL, WANG Y, *et al.* Advances in the application of biosensors in the field of food detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(3): 845–851.
- [69] SHI R, ZOU W, ZHAO Z, *et al.* Development of a sensitive phage-mimotope and horseradish peroxidase based electrochemical immunosensor for detection of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides [J]. *Biosens Bioelectron*, 2022, 218: 114748.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

## 作者简介



马小勇, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测与控制。  
E-mail: 2521292282@qq.com



熊颖, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全检测与质量控制。  
E-mail: yingxiong201468@163.com