

分子印迹技术在真菌毒素检测中的应用

何庆华, 许 杨

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 江西 南昌 330029)

摘 要: 旨在综述分子印迹技术在真菌毒素检测中的应用, 介绍分子印迹技术的原理、聚合物制备的过程以及评价聚合物性能的指标, 并介绍粮食中常见真菌毒素: 玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素分子印迹聚合物的制备及其在固相萃取、生物传感器中检测真菌毒素的应用, 分析分子印迹技术在真菌毒素检测领域的前景以及需要解决的问题。

关键词: 分子印迹聚合物; 真菌毒素; 固相萃取; 生物传感器

Application of Molecular Imprinting Technique in Determination of Mycotoxin

HE Qing-hua, XU Yang

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330029, China)

Abstract: The review introduced the theory of molecular imprinting technique, the process of producing molecularly imprinted polymer (MIP), the indexes for evaluating MIP properties, the MIP preparation of some common mycotoxins in grains such as zearalenone, ochratoxin A, deoxynivalenol and aflatoxin, and the application of mycotoxin-MIP in determination of mycotoxin by solid phase extraction and biosensor, and analyzed the prospect and problems to be solved on the application of molecular imprinting technique in determination of mycotoxin.

Key words: molecularly imprinted polymer (MIP); mycotoxin; solid phase extraction; biosensor

中图分类号: R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)11-0273-03

真菌毒素是由真菌产生的次级代谢产物, 主要由曲霉菌、青霉菌和镰刀菌产生, 目前已知有 200 余种真菌毒素, 常见的种类主要有黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、伏马毒素、T-2 毒素和玉米赤霉烯酮^[1-2]。人或动物摄入被真菌毒素污染的农、畜产品, 通过吸入或皮肤接触真菌毒素可引发多种中毒症状^[3-5]。截止 2003 年底, 已有 99 个国家对食品或饲料中真菌毒素的含量制定了法规, 这些国家的人口约占世界总人口的 87%^[6]。

检测真菌毒素的方法包括高效液相色谱、气相色谱、酶联免疫检测、胶体金免疫层析等^[7-10], 色谱检测法耗时较长且需昂贵的免疫亲和柱进行样品前处理, 难以大规模使用, 免疫学检测方法简单、快速、成本低且可进行大规模筛选, 然而该类方法均建立在抗原和抗体特异性结合的基础之上, 真菌毒素全抗原及抗体均为蛋白质分子, 在高温、强酸、强碱等极端检测环境下极易失活变性。分子印迹技术的出现为真菌毒素的快速提取和检测提供了一条新的途径, 通过该技术制备与真

菌毒素特异性结合的分子印迹聚合物(molecular imprinted polymer, MIP), 不仅成本低廉、耐高温、酸碱并可重复使用, 若将其运用于固相萃取柱中则可替代免疫亲和柱, 也可作为识别原件运用于传感器中制备可在线检测、重复使用的生物传感器。

1 分子印迹技术

分子印迹技术来源于免疫学的发展, 是指制备对某一特定的目标分子具有特殊选择性的聚合物的过程, 被形象地称为制造识别“分子钥匙”和“人工锁”的技术。1993 年瑞典的 Mosbach 在《Nature》上发表有关茶碱 MIP 的研究报道后, 分子印迹技术得到了蓬勃的发展。MIP 具有三大特点: 构效预定性、特异识别性和广泛实用性^[11-12]。基于该技术制备的 MIP 具有亲和性和选择性高、抗恶劣环境能力强、稳定性好、使用寿命长、应用范围广等特点, 在色谱分离、固相萃取、仿生传感、膜分离等领域展现了良好的应用前景, 并由此成为了高分子化学、生物化学和材料科学等交叉学

收稿日期: 2008-09-16

基金项目: 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索类课题

作者简介: 何庆华(1980-), 男, 助理研究员, 主要从事食品安全快速检测研究。E-mail: heqinghua1980@126.com

科学研究的新兴领域之一^[13]。

1.1 分子印迹技术原理

分子印迹技术的原理是, 首先功能单体与模板分子间相互作用形成单体-模板分子复合物, 然后功能单体与交联剂交联聚合形成聚合物, 将模板分子固定下来, 最后再通过一定的物理或化学方法把模板分子提取出来, 从而在聚合物中留下一个与模板分子特异性结合的功能基的三维空穴, 对模板分子具有专一性识别作用^[14]。

1.2 MIP 的制备

制备 MIP, 首先需要选择合适的功能单体, 目前功能单体或复合功能单体的种类主要有: 甲基丙烯酸、丙烯酰胺、2-己烯基吡啶、2-己烯基吡啶-丙烯酰胺、2-己烯基吡啶-甲基丙烯酸等^[15], 模板分子与功能单体的摩尔比直接影响到分子印迹聚合物的特异性及吸附能力。其次, 选用合适的模板分子溶剂将功能单体与模板分子充分振荡, 使其充分作用的同时加入交联剂和引发剂, 充分混合后进行通氮脱氧, 在真空状态下密封, 目前常用三甲基丙烯酸酯或乙二醇二甲基丙烯酸酯作为交联剂, 偶氮二异丁腈或偶氮二戊腈作为引发剂。将密封好的安培瓶至于水浴中, 热引发聚合反应或在波长 365nm 紫外灯照射下光引发聚合, 得到坚硬的分子印迹聚合物, 粉碎聚合物过筛, 选用有机溶剂将模板分子去除, 并同时检测洗脱液, 直到检测不出模板分子为止, 则聚合物制备完成。

1.3 MIP 性能评价

评价 MIP 性能指标主要是通过测定 MIP 对底物的吸附能力和吸附选择性, 通过静态平衡结合法测定模板聚合物的结合动力学, 通过 Scatchard 分析法研究 MIP 对模板分子的结合特性^[16]。MIP 因其可模拟自然系统、具有很强的识别特性, 将其与不同换能装置相结合便可制备出基于光、电、质量等的模拟生物传感器。

2 真菌毒素-MIP 的制备及应用

2.1 赭曲霉毒素 A-MIP

赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA) 分子式为 $C_{20}H_{18}ClNO_6$, 分子量为 404, 属于香豆素类。OTA 在受热及紫外照射的条件下容易分解, 若直接使用 OTA 作为模板分子难以得到与之特异结合的 MIP, 并且 OTA 价格昂贵, 普通实验室难以承受, 假模板聚合(dummy template polymerisation)技术的使用有效地解决了这个问题, 该技术就是通过人工合成与模板分子基本结构类似的化合物, 该化合物保持了模板分子的框架结构, 大小和形状与模板分子相似, 但成本低廉、耐热、耐酸。

Claudio 等^[17]选用 L-Phe-CHNA 作为 OTA 模板分子的类似物制备 OTA-MIP, 首先以氯仿为溶剂加入甲基

丙烯酸和 EDMA(ethylendimethacrylate), 60℃ 热聚合, 粉碎聚合体后过筛, 选取 30~90 μm 大小的颗粒, 溶剂去除模板分子, 直到洗脱液检测不到为止, 结果显示 OTA-MIP 与 OTA 和 L-Phe-CHNA 的选择系数分别为 0.7 和 1.0, 发现 OTA 分子结构中 L-苯丙氨酸上的羧基、氨基桥结构、苯羟基结构对于分子印迹聚合物的特异性结合具有决定性的作用。

2.2 玉米赤霉烯酮-MIP

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)又称 F-2 毒素, 是由镰刀菌产生的 2,4-二羟基苯甲酸内酯类化合物, 具雌激素活性。ZEN 价格昂贵且具有致癌性, Urraca 等^[18]选用环十二烷-2,3-二羟基苯甲酸(CDHB)作为替代 ZEN 的模板分子, 1-烯丙基哌嗪(1-ALPP)为功能分子, TRMM(trimethyltrimethacrylate)为交联剂, 在乙腈的引发下充分振荡, 混合后进行通氮脱氧, 在真空状态下密封至于水浴中, 热引发聚合反应 24h, 得硬状物体, 磨碎过筛后用甲醇加速萃取去除模板分子, HPLC 监测洗脱分子直到检测不到 CDHB 为止, 丙酮重悬浮聚合物数次, 挑选出 25~50 μm 大小的颗粒, 40℃ 真空干燥 24h, 得 ZEN-MIP, 同样的方法制备不加模板分子的印迹物作为对照。Urraca 等在选用 CDHB 作为模板分子的同时, 也选用了间苯二酚甲酸和雷琐幸作为模板分子对照, 这两种化合物都和 ZEN 结构相似, 含有苯环和羟基, 但其大小、形状以及亲水性都与 CDHB 和 ZEN 极为不同, 结果显示以 CDHB 为模板分子的聚合物与 ZEN 的保持系数(retention factor, K)和印迹系数(imprinting factor, IF)分别为 3.13 和 10.19, 而以间苯二酚甲酸和雷琐幸为模板的保持系数(K)和印迹系数(IF)分别为 0.7, 2.41 和 0.91, 3.43, 表明模板分子结构的大小和形状, 亲水性对于 ZEN-MIP 的成功合成为关键因素。

2.3 脱氧雪腐镰刀菌烯醇-MIP

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称为呕吐毒素, 常见于被真菌污染的谷物及其制品中。目前用于检测 DON 的方法主要是高效液相色谱和气相色谱法, 由于检测样品多为谷物及饲料, 干扰杂质较多, 基质干扰会严重影响检测的准确性, 通常采用免疫亲和柱进行净化后再配合高效液相使用。Pascale 等^[19]以衣康酸为功能单体, DON 为模板分子, 以光聚合方式合成了 DON 的分子印迹聚合物, 并将其制备成固相萃取柱用于 DON 的提取, 分别选用了水、甲苯、水-PEG、乙腈、乙腈-水作为洗脱液, 回收率分别为 97%、98%、93%、40%、30%。在意大利面条样品中分别加入 2000ng/g 和 750ng/g DON 标准品, 过 DON-MIP 固相萃取柱进行回收, 经 HPLC 检测, 平均回收率分别为 80% (cv=7%, n=3) 和 73% (cv=6%, n=3), 最低检测限可达

80ng/g, 表明 DON-MIP 固相萃取柱对 DON 有很好的特异性吸附。

2.4 黄曲霉毒素-MIP

黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素, 黄曲霉毒素 B₁ 是二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物, 即含有一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮(香豆素), 前者为基本毒性结构, 后者与致癌有关。Serheeva 等^[20]通过计算机模拟技术筛选功能单体合成能识别总黄曲霉毒素的 MIP, 并将 MIP 以网格分布的方式固定于多孔渗透薄膜上, 以制备能识别总黄曲霉毒素的膜感应器。该研究选用丙烯酸、二乙胺基乙基丙烯酸甲酯、N,N- 亚甲基双丙烯酰胺作为功能单体, 并用计算机模拟技术筛选出最优的功能单体——N,N- 亚甲基双丙烯酰胺, 其与 AFB₁、B₂、G₁ 的结合能力最佳, 以此聚合物制备的膜感应器检测总黄曲霉毒素, 检测范围可达 $1 \times 10^{-9} \sim 1000 \times 10^{-9}$ 。

3 展 望

分子印迹技术目前已经成为多学科交叉研究的热点领域, 真菌毒素-MIP 的研究将有望制备出可重复使用、耐酸碱和高温的固相萃取柱以取代传统的免疫亲和层析柱, 将极大的降低检测成本, 满足基层检测单位的需要, 同时真菌毒素-MIP 还可作为识别元件与不同换能装置相结合制备出基于光、电、质量等的模拟生物传感器, 可实时在线检测样品中的真菌毒素, 方便检测人员的使用。但同时真菌毒素-MIP 也有自身的一些局限性: (1)作为模板分子的真菌毒素价格昂贵, 难以大量地投入使用; (2)真菌毒素-MIP 的确切立体结构尚难以确定; (3)聚合物常表现出不理想的吸附等温线以及较慢的质量传递, 将限制 MIP 作为分离介质的使用; (4)当溶剂改变时, MIP 易膨胀从而导致难以恢复的聚合物空腔构型改变, 降低了 MIP 吸附特异性。

参考文献:

- [1] BALAZS E, SCHEPERS J S. The mycotoxin threat to food safety[J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 119(1/2): 1-2.
- [2] BOUDRA H, MORGAVI D P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*[J]. Animal Feed Science and Technology, 2005, 120(1/2): 113-123.
- [3] YANG J Y, ZHANG Y F, WANG Y Q, et al. Toxic effect of zearalenone and α -zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells[J]. Toxicology in vitro, 2007, 21(4): 558-565.
- [4] MEISSONNIER G M, PINTON P, LAFFITTE J, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B₁: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 231(2): 142-149.
- [5] COLLINS T F X, SPRANDO R L, BLACK T N, et al. Effects of Deoxynivalenol (DON, vomitoxin) on in utero development in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(6): 747-757.
- [6] VAN EGMOND H P, JONKER M A. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003[C]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
- [7] SONGSERMSAKUL P, SONTAG G, CICHNA-MARKL M, et al. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 843(2/3): 252-261.
- [8] CECI E, BOZZO G, BONERBA E, et al. Ochratoxin A detection by HPLC in target tissues of swine and cytological and histological analysis [J]. Food Chemistry, 2007, 105(1): 364-368.
- [9] BOHM C, CICHNA-MARKL M, BRENN-STRUCKHOFFOVA Z, et al. Development of a selective sample clean-up method based on immuno-ultrafiltration for the determination of deoxynivalenol in maize[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1202(2): 111-117.
- [10] NURYONO N, NOVIANDI C T, BOHM J, et al. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography[J]. Food Control, 2005, 16(1): 65-71.
- [11] VALLANO P T, REMCHO V T. Highly selective separations by capillary electrochromatography: molecular imprint polymer sorbents[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 887(1/2): 125-135.
- [12] 熊艳. 分子印迹识别化学发光分析[D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [13] PAVEL D, LAGOWSKI J. Computationally designed monomers and polymers for molecular imprinting of theophylline: part II[J]. Polymer, 2005, 46(18): 7543-7556.
- [14] 草竹君. 基于分子印迹聚合物识别的流通式化学发光传感器的研究 [D]. 重庆: 西南师范大学, 2005 年.
- [15] LIU F, LIU X, SIU-C N, et al. Enantioselective molecular imprinting polymer coated QCM for the recognition of L-tryptophan[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 113(1): 234-240.
- [16] MONTI S, CAPPELLI C, BRONCO S, et al. Towards the design of highly selective recognition sites in molecular imprinting polymers: a computational approach[J]. Biosensor and Bioelectronics, 2006, 22(1): 153-163.
- [17] BAGGIANI C, GIRAUDI G, VANNI A. A molecular imprinted polymer with recognition properties towards the carcinogenic mycotoxin ochratoxin A[J]. Bioseparation 2002, 10: 389-394.
- [18] URRACA J L, MARAZUELA M D, MERINO E R, et al. Molecularly imprinted polymers with a streamlined mimic for zearalenone analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116: 127-134.
- [19] PASCALEA M, GIROLAMO A D, VISCONTI A, et al. Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 609: 131-138.
- [20] SERHEEVA T A, PILETSKA O V, BROVKO O O, et al. Aflatoxin-selective molecularly-imprinted polymer membranes based on acrylate-polyurethane semi-interpenetrating polymer networks[J]. Ukr Biokhim Zh, 2007, 79(5): 109-15.