

食源性病原及其毒素检测技术研究进展

陈念^{1,2}, 赵斌^{1,2}, 王乾蕾³, 潘柯伊³, 高向阳⁴

(1. 中山火炬职业技术学院生物医药系, 广东中山 528436; 2. 国家中药现代化工程技术研究中心中山健康产品分中心, 广东中山 528436; 3. 中山市食品药品检验所, 广东中山 528400; 4. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要 食源性病原包括细菌、真菌、病毒、朊病毒和原虫, 它们在生产加工及储运环节污染食物, 同时不断分泌包含毒素在内的各种成分到细胞外直至自身死亡和裂解, 其中一些病原菌及其毒素能耐受复杂的食物加工, 直至进入人体干扰细胞生理过程并引发疾病。详细介绍了如何利用各种“组”学(包括蛋白质组、肽组、代谢组和食品组学)技术检测和寻找食源性病原微生物的生物标志物, 深入了解其产毒机理、毒力和致病机理, 及对胁迫的适应能力。这对于追踪食源性病原微生物内、外毒素的来源, 保证食品安全并控制食源性疾病爆发具有重要意义。

关键词 食源性病原; 细菌; 真菌; 毒素; 蛋白质组学

中图分类号 TS207 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)25-0099-06

Progress in the Detection Methods for the Pathogens and Their Toxins from Food

CHEN Nian^{1,2}, ZHAO Bin^{1,2*}, WANG Qian-lei³ et al (1. Department of Biomedicine, Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan, Guangdong 528436; 2. National Engineering Research Center for Modernization of TCM, Zhongshan Health Product Subcenter, Zhongshan, Guangdong 528436; 3. Zhongshan Institute for Food and Drug Control, Zhongshan, Guangdong 528400)

Abstract Pathogens from food are mainly bacteria, fungi and some viruses, prions and protozoa, they contaminate food during production, processing, storage and transportation. These microorganisms could secrete many toxins into the extracellular environment. Some bacteria and fungal toxins are resistant to inactivation, and can survive during food preparation. These chemicals are always involved in the pathogenesis. This paper reviews the use of proteomics, peptidomics and metabolomics, in addition to other food omics methods for the detection of pathogenic fungi and bacteria, and their biomarkers. These techniques were useful for discovering the pathogenicity of foodborne pathogens, determining their function mechanisms, and monitoring food safety and prevent the outbreak of food-borne diseases.

Key words Foodborne pathogens; Bacteria; Fungus; Mycotoxins; Proteomics

近年来,随着食品贸易的全球化发展,以及鼓励生鲜、干货和新奇食材等新的营养消费趋势,使得食源性疾病的发生频率显著增加。人食源性疾病主要由食源性病原(细菌、真菌、病毒和寄生虫)及其毒素污染食物所引起,这些疾病极易扩散并引发广泛的公共健康问题^[1]。2013年,欧盟共报道了5 196起食源性疾病事件,引起43 183人感染、5 946人住院治疗、11人死亡;代表性的如德法两国近年来频繁发生志贺毒素(Shiga toxin)食源性食物中毒事件。在美国,每年约有940万起食源性疾病事件发生,引起55 961人住院、1 351人死亡。

检测食物病原并保护食物免于腐败变质对于维护公共健康具有重要意义,由于病原通常还能产生致病性毒素,因此只有同时检测病原及其毒素才能保证食物安全。部分食物病原及其毒素具耐热性,常规的食物加工和制备方法很难完全将其破坏,使得食物的安全控制变得更加复杂化^[2]。在食物的生产、储存和运输阶段,以蛋白质组、肽组和代谢组为代表的食物组学分析技术已成功用于鉴定食物样品中的食源性病原及其毒素,笔者对近年来相关领域的进展进行了综述。

1 细菌性食物病原及细菌毒素

1.1 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析细菌特征

一直以来常用的表型鉴定方法(如菌

落特征、选择性平板、生化特征、革兰氏染色)因较耗时,而逐渐被效率更高、更准确和可靠的MALDI-TOF-MS方法所取代用于细菌鉴定,后者仅需将细菌菌落引入MALDI平板,用胰蛋白酶消化核糖体或细胞内蛋白,将得到的部分或完整细菌细胞MALDI-TOF-MS肽指纹谱与标准光谱数据库中的数据进行匹配,即能准确鉴定菌种。副结核分枝杆菌亚种(*Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*, MAP)能感染反刍动物并引起类结核,该耐热菌还易通过牛奶传递给人,过去常用酶联免疫吸附法(ELISA)鉴定牛MAP,但该方法因敏感性较低而难以检测早期感染,还会与环境中的分枝杆菌发生交叉反应。为了满足临床早期、快速、准确检测产毒菌株的要求,以2D凝胶电泳+质谱、MALDI-TOF-MS为代表的蛋白质组方法已经逐渐得到推广应用(表1)。

目前,MALDI-TOF-MS应用于食品检测的技术瓶颈主要在于微生物分离和培养,尤其对于厌氧、生长条件苛刻或生长缓慢的菌株,建议对于此类无法培养或难以培养的菌株,如霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic E. coli*)、弗氏志贺菌(*Shigella flexneri*)和肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*),可针对性地开发相关的样品制备协议。值得一提的是,一方面,某些细菌可能不会对人类健康造成威胁,但其分泌的蛋白可能对人体具有强烈的毒性;另一方面,MALDI-TOF-MS技术仅能检测食物是否染菌,但无法获知毒素编码基因表达或毒素含量相关的信息。

1.2 应用蛋白质组学技术检测细菌毒素 细菌毒素分为内毒素和外毒素,前者为脂多糖,位于G⁻细菌外膜,细菌生长时很少分泌,但在自溶或受外界因素(如抗生素、宿主免疫噬

基金项目 中山市社会公益重大专项(2015B2296);广东省科技计划项目(2016A020210007)。

作者简介 陈念(1980—),男,土家族,湖北宜昌人,副研究员,博士后,从事现代生物技术医药领域的应用研究。

收稿日期 2017-07-05

表 1 常见细菌毒素及其蛋白质组学检测方法

Table 1 Common bacterial toxins and detection methods of their proteomics

细菌 Bacteria	毒素 Toxins	检测方法 Detection methods
金黄色酿脓葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	葡萄球菌肠毒素 Staphylococcal enterotoxin (SE)	SDS PAGE MALDI TOF MS ^[3] ; MALDI TOF/TOF MS ^[4] ; IC ELISA ^[5] ; LC MS ^[6] ; LC MS/MS ^[7] ; PSAQ MS ^[8] ; PSAQ MS/MS ^[9] ; Immuno capture PCR ELISA ^[10]
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	志贺毒素 Shiga toxin (Stx) 不耐热肠毒素 Heat labile enterotoxin	MALDI TOF/TOF MS ^[11] LC MS 和 MALDI TOF MS ^[12]
肉毒梭状芽孢杆菌 <i>Clostridium botulinum</i>	肉毒菌神经毒素 Botulinum neuro toxin (BoNT)	Mouse bioassay ^[13] ; Endopep MS ^[14] PSAQ MS/MS ^[9]
产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	ϵ -毒素 Epsilon toxin (ETX)	SDS PAGE LC MS/MS ^[15]
艰难梭状芽孢杆菌 <i>Clostridium difficile</i>	艰难梭状芽孢杆菌毒素 A 和 B TcdA 和 TcdB	ID MALDI TOF MS 和 LC MS/MS ^[16]
炭疽杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	炭疽致死因子 Anthrax lethal factor	LC MS/MS ^[17]
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	呕吐毒素 Cereulide	2DE MALDI TOF/TOF ^[18] ; SDS PAGE LC MS/MS ^[19]
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌肠毒素 B. subtilis enterotoxin	SDS PAGE LC MS/MS ^[20]
空肠弯曲杆菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	细胞膨胀致死毒素 (CDT) Cytolethal distending toxin	LC MS/MS ^[21]
单核细胞增多性李斯特氏菌 <i>Listeria monocytogenes</i>	李斯特菌溶血素 Listeriolysin O	MALDI TOF MS ^[22]
小肠结肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	耶尔森氏菌热稳定肠道毒素 Yersinia stable toxin (Yst)	LC MS/MS ^[23]
沙门氏肠菌 <i>Salmonella</i> sp.	沙门氏菌肠毒素 Salmonella enterotoxin (Stn)	

菌细胞)影响溶菌后则易被释放,因此,其通常在细菌生长后期作用,中等毒性且对热稳定;后者为 G⁺ 或 G⁻ 细菌分泌的蛋白(某些外毒素仅当细菌裂解时才释放),常通过酶促反应起作用,威胁和特异性均强于前者,而且可在远离细菌生长的位置远程发挥作用。2013 年,欧洲有约 16% 的食源性事件都是由主要来自蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的细菌外毒素所引起的。

1.2.1 不依赖凝胶的蛋白质组学方法。葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal enterotoxins, SE) 是金黄色葡萄球菌产生的耐胃肠道蛋白酶解的外毒素,耐热、酸和 pH 变化,加工过程中较稳定,分 23 种血清型,其中 SEA 和 SEB 引起的葡萄球菌食源性疾病各占 80% 和 10%。卫生条件是 SE 污染食物的主要原因,目前 SE 检测主要采用免疫亲和技术,也有使用 MALDI-TOF-MS,前者要求提前制备肠毒素特异性抗体(目前仅可获得 SE A-E、G、H 和 Q),技术流程复杂且成本高昂,制备的抗体还常与肠毒素性质相似的分子发生交叉反应。一种无需标记的同位素稀释 LC ESI MS/MS 方法被用于检测牛奶和虾中的 SEA 和 SEB,检测限达 2.5 ng/g (SEA) 和 5.0 ng/g (SEB)。Sospedra 等^[6]使用单级三重四级质谱代替串联质谱检测牛奶和果汁中的 SEA 和 SEB,可能由于样品制备误差使检测限减少了一个数量级。Dupre 等^[9]用同样的方法定量人体液和食物中的 SEB、蓖麻毒素 (Ricin) 和内毒素 (ETX),检测限低至 1 ng/mL。

食物中多数外溢蛋白 (exo proteins) 能耐热加工处理,但部分肉毒杆菌 (*C. botulinum*) 株系产生的致死性极强的肉毒菌神经毒素 (Botulinum neurotoxin, BoNT, 自身具蛋白水解酶活性) 则极易受热变性。一直以来,小鼠活体注射生物分析

法被作为 BoNT 定量检测的金标准,但存在误差大、成本高和伦理学等缺点;免疫学方法(如 ELISA)敏感性高,但易发生交叉反应或假阳性。内肽酶活力分析法 (Endopeptidase activity assays) 基于 BoNT 固有的水解酶活性,偶联质谱仪与反应室可快速检测底物分裂位置,被用于鉴定血清型。Kuklenyik 等使用 MALDI-TOF-MS/HPLC-ESI-MS/MS 和内肽酶活力分析法对其酶催化活性的炭疽病致死因子定量测定的效果进行了比较,其中同位素稀释 MALDI-TOF-MS 方法更快、更准确可靠。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一种产芽孢的 G⁺ 细菌,污染面粉、面包和酵母且耐烘烤,萌发的孢子能引起面包变质,结合无标记定量 LC-MS-MS 和生物信息学分析,对生长受抑制情况下枯草芽孢杆菌的蛋白质组变化进行研究,检测到的差异表达的蛋白主要为涉及蛋白质合成和能量代谢的酶和辅因子,以及包含热激蛋白在内的分子伴侣;结合 2DE、DIGE 和 iTRAQ 分析,使用多元定量方法对抗微生物剂桃拓酚 (Totarol) 处理后枯草芽孢杆菌的变化进行分析,共鉴定了 139 种差异表达的蛋白,其中涉及中心代谢、无氧呼吸、亚铁血红素生物合成及细胞内环境稳定的关键酶的表达均显著下调。利用 LC-MS 对艰难梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*, 可形成孢子的 G⁺ 细菌,能感染人结肠引起腹泻) 的分泌蛋白质组 (Secretomes) 进行研究,在上清液中鉴定了 158 种蛋白。Ternan 等使用 LC-MS 基于“指数改良的蛋白质丰度指数 (exponentially modified protein abundance index, emPAI)”光谱计数方法测定了热胁迫(从 37 °C 提高到 41 °C) 响应下的蛋白质组变化,有 65 个蛋白 (37%) 变化程度超过 1.5 倍,41 °C 时运动相关的鞭毛丝蛋白表达减少了 2.7 倍。

沙门氏菌属的沙门氏肠菌 (*Salmonella enteritidis*) 和 *S. bongori* 是全球性食源性病原,前者为细胞内病原,在宿

主细胞内的膜结合区——沙门氏菌囊泡 (Salmonella containing vacuoles, SCVs) 进行复制。伤寒沙门杆菌 (*S. typhi*) 及其他非伤寒血清型可分泌伤寒毒素 (Typhoid toxin), 该细胞致死膨胀毒素 (Cytolethal distending toxin, CDT) 由 CdtB (DNase I 样催化活性)、PltA (ADP 核糖基化活性) 和 PltB 3 个亚基组成 (Plt 对于 CdtB 的分泌是必需的), 通过结合含 N-乙酰神经氨酸末端的多糖链的细胞而产生毒性。产志贺毒素的 *E. coli* O104: H4 可能对人造成致命伤害, 而其他无毒的大肠杆菌菌株则常被作为工业或模式微生物, 相关的蛋白质组已进行了大量研究, 如不同生长阶段蛋白质改变以及各种抗微生物试剂对它们的影响。单核细胞增多性李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*, G⁺) 是食物加工的主要污染菌, 适应温度范围广, 其毒性主要来自李斯特菌溶血素 (Listeriolysin O, 外毒素), 抑制剂对其蛋白质组的影响已使用 LC-MS/MS 和定量无标记 LC-MS/MS 进行了研究。细菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*, G⁻) 及其肠道毒素 Yst 感染主要来自生的水果和蔬菜, 耐低温冷藏, 可引起小肠结肠炎。弯曲菌属 (*Campylobacter*) 的空肠弯曲杆菌 (*C. jejuni*) 常引起人急性感染性痢疾, 其发病率甚至超过沙门氏菌属, 与其他细菌不同, 空肠弯曲杆菌兼具 N-连接和 O-连接 2 个糖基化系统, 其糖蛋白含有细菌特异性的单糖“Pseudaminic acid (一种类似唾液酸的糖衍生物)”和“Diacetamidobacillosamine”, 这对于其特异性检测非常重要。

1.2.2 基于凝胶的蛋白质组学方法。分泌蛋白质组研究有助于阐明细菌中各种蛋白组分的致病机理, 为了富集低丰度蛋白, 常首先利用 LC 或凝胶电泳等方法对完整的蛋白质组进行预分级。以牛奶蛋白为例, 蛋白混合物经 SDS-PAGE 分离后, 将切割下来的电泳条带用胰蛋白酶消化后提取并测定 SEA, 鉴定了 19 种标准 SEA 胰蛋白酶水解肽 (序列盖度 73%)。Enany 等^[24]用 SDS-PAGE 和强阳离子交换树脂对甲氧西林抗性的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, MRSA) 的分泌蛋白质组进行预分级后再用串联质谱分析, 鉴定了 174 种蛋白, 随后又结合 SDS-PAGE 和 LC-MS/MS 对 MRSA 和甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌 (MSSA) 的分泌蛋白质组进行比较研究, 分别鉴定了 261 种 (MRSA) 和 168 种 (MSSA) 细胞外蛋白, 其中 144 种由 MRSA 独有, 其中极可能含有该菌株的毒力因子。Quiblier 等^[25]用 LC-MS/MS 对分泌途径辅助蛋白 SecDF 研究发现, secDF 缺失在引起胞外蛋白质组 (exoproteome) 变化的同时, 金黄色葡萄球菌对宿主细胞的吸附、入侵和毒性也同时下降。使用 SDS-PAGE 预分级组合“LTQ Orbitrap XL”质谱仪对蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) secDF 敲除突变体的分泌蛋白质组进行研究, 也发现同样的变化, 突变体分泌蛋白质组中 3 种最常见的痢疾肠道毒素水平均低于野生型。蜡样芽孢杆菌天然生长于低氧的小肠环境, 对其在 3 种不同培养条件下 (低氧化还原电势 - Oxidation potential/ORP + 缺氧、高 ORP + 缺氧、有氧) 的分泌蛋白质组进行比较, 共鉴定了 57 种分泌性毒力相关蛋白 (其中新发现 31 种)。

利用 2D 凝胶电泳偶联 MALDI-TOF/TOF 对产气荚膜梭菌 (*C. perfringens*) A、C 型菌株的胞外蛋白质进行比较, 发现了一些在其他 G⁺ 细菌胞外蛋白质组中从未报道过的蛋白, SagA 蛋白、DnaK 型分子伴侣 hsp70、内 β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶作为分泌丰度最高的蛋白, 可作为食物样品中产气荚膜梭菌的检测标记 (进化保守且与最近相似蛋白同源性低至 ≤50%)。

2 真菌性食物病原与真菌毒素

在真核食物病原中, 产毒微藻的毒力最强但食用较少, 毒力相对较弱的食源性病原真菌与细菌一起共同构成食物变质最常见的原因。病原性真菌主要来自青霉属 (*Penicillium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、镰刀菌属 (*Fusarium*) 等丝状真菌, 由于栽培、加工或储藏不当等因素, 其感染可食用植物和饲料后合成真菌毒素, 并通过食物链继续传递给动物或人。

Braaksma 等^[26]结合 SDS-PAGE 与 LC-MS/MS, 鉴定了黑曲霉 (*A. niger*) 生长相关联的分泌蛋白质组; Ji 等^[27]用凝胶电泳与 Q TOF 分析了禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*) 分泌蛋白质组, 鉴定了 87 种蛋白 (其中 63 种与生物信息学预测结果一致)。一种类似 SDS-PAGE 升级版的“Blue Native (BN)-PAGE”技术被用于鉴定哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 分泌蛋白质组; 同位素标记相对和绝对定量 (Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ) 被用于定量烟曲霉 (*A. fumigatus*)、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 和里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 的分泌蛋白质组; 将稳定同位素加入生长培养基中的代谢标记方法也较常用, 如氨基酸同位素标记 (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) 被用于研究酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 蛋白质组^[28]; 除了化学标记和代谢标记外, 还有一种无标记的 MS 方法也被用于定量研究嗜热裂孢菌 (*Thermobifida fusca*) 和豌豆锈病菌 (*Uromyces appendiculatus*) 的分泌蛋白质组, 两者分别采用了基于 emPAI 和“归一化光谱丰度因子 (Normalized spectra abundance factor, NSAF)”不同的光谱计数方法。

控制真菌毒素风险最可靠的方法是防止真菌生长, 消除肉眼可见的真菌不代表就没有真菌毒素, 许多真菌毒素能抵抗复杂的食品加工过程并长时间存留于食物中, 因此, 检测真菌毒素比检测分泌毒素的真菌更为重要。近年来有关利用蛋白质组技术检测食物中常见真菌毒素的报道参见表 2。

目前, 全球已鉴定了 ≥400 种真菌毒素, 其中研究最多也是最常见的来自食源性真菌的低分子量毒素包括黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、棒曲霉毒素, 以及包含伏马菌素 (Fumonisin)、玉米烯酮 (Zearalenone, ZEN)、单端孢霉烯族毒素 (Trichothecenes) 和脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON) 在内的镰刀菌真菌毒素。天然环境中真菌毒素最主要的功能是抑制和杀灭周围的竞争性微生物, 这些次生代谢物即使在低浓度对于动物和人也常具有毒性, 表现为细胞毒性、致癌或致畸变, 可引起严重的健康问题。许多真菌毒素都是耐热的, 因此很难完全控制其污染, 常见的方法有抑制真菌生长、食

表2 常见真菌毒素及其蛋白质组检测和样品制备方法

Table 2 Common mycotoxins and their protein detection and sample preparation method

真菌 Fungus	真菌毒素 Mycotoxins	检测方法 Detection methods	样品制备方法 Sample preparation method
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	黄曲霉毒素 Aflatoxin 赭曲霉毒素 Ochratoxin	LC MS/MS ^[29] 荧光极化免疫分析 ^[31] LC MS ^[33] LC MS/MS ^[32] ID LC MS ^[35] IC ELISA ^[36]	DLLME ^[30] SPE ^[32] SPE ^[32] SPME ^[34] DLLME ^[30] —
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol 玉米烯酮 Zearalenone 单端孢霉烯族毒素 Fumonisin	LC MS/MS ^[29] SPR ^[37] LC MS/MS ^[29] Orbitrap HRMS ^[39] GC-MS ^[40] Orbitrap HRMS ^[41]	QuEChERS ^[29] “Dilute & shoot” ^[38] DLLME ^[30] ; QuEChERS ^[29] QuEChERS ^[39] “Dilute & shoot” ^[38] —
青霉菌属 <i>Penicillium</i>	棒曲霉素 Patulin 橘霉素 Citrinin LC MS/MS ^[44]	ID LC MS/MS ^[42] SPR ^[43] SPE ^[44]	SPE ^[42] SPE ^[44] —
麦角菌属 <i>Claviceps</i>	麦角生物碱 Ergot alkaloids	LC FLD ^[45]	SPE ^[46]

品净化和脱毒,此外,加入胃肠道真菌毒素结合剂(减少其生物利用度)或添加有益的肠道细菌(使毒素在吸收前即降解或酶法转化为低毒化合物),也是值得推荐的控制真菌毒素危害的方法。

2.1 待检样品的制备 检测食物中真菌毒素的第1步是选取和制备样品。正确的清洁样品对于获得准确、可靠的试验数据非常重要,尤其对于极低浓度的目标化合物。“Dilute & Shoot”是最简单的制备真菌毒素待检样品的方法,即将样品稀释后不经过滤直接注入 LC。固相萃取(Solid phase extraction, SPE)是最常用的预浓缩真菌毒素样品的方法。Campane 等^[32]使用加压溶剂提取和在线 SPE 提取偶联 UH-PLC-MS/MS 全自动检测干燥水果中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A(OTA)。Tolgyesi 等^[44]使用聚合物柱 SPE 结合 LC-MS/MS 对小麦、番茄汁和太阳花种子中的链格孢属(*Alternaria*)毒素进行分离和定量,包括交链孢霉烯(Altenuene)、链格孢毒素(Tentoxin)和细交链孢菌酮酸(Tenuazonic acid, TeA)等,定量范围达 1~10 μg/kg,但该方法存在耗时、耗费大量有机溶剂且成本高等缺点。采用 SPE 方法时,固定相的吸附作用会造成样品损失,且固相与样品间的相互作用还受 pH 和溶剂类型等因素的影响,基于 SPE 升级而来的固相微萃取(Solid phase microextraction, SPME)技术使溶剂用量减少至几毫克,该方法已用于坚果、小麦、玉米和谷物中 OTA 和 OTB 的测定。

分散液液微提取(Dispersive liquid liquid micro extract, DLLME)和 QuEChERS——“Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe”是 2 种较新出现的提取方法,适合同时分析多种真菌毒素:①DLLME 升级自液液提取(Liquid liquid extraction, LLE)技术,该技术简单、高效,且溶剂消耗量远低于后者;DLLME 偶联 LC MS/MS 被用于测定水样中的 6 种雌激素、玉米中的 ZEN,以及稻米中的黄曲霉毒素(AFB)和 OTA。②QuEChERS 方法制备样品仅需“三步”——加入溶剂、用盐将水隔开、使用分散 SPE 清洗;QuEChERS 偶联 LC-MS/MS

已成功用于多种真菌毒素的同时检测,如鸡蛋(ZEN、DON、AFB1 及其代谢物)和酒(36 种真菌毒素)^[47]。

2.2 免疫化学与色谱检测方法 免疫化学与色谱是 2 类最常用的真菌毒素检测方法,其中免疫化学方法以表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)和 ELISA 为代表,两者均依赖于针对真菌毒素的特异性抗体:①SPR 生物传感器^[48]。将分子印迹聚合物通过单链的 DNA 或 RNA 寡核苷酸适配体固定在 SPR 芯片表面,可检测 DON、红曲米中的橘霉素;Zhu 等^[49]将 OTA 靶向适配体经生物素与固定于传感器芯片表面的链霉亲和素交联,定量检测酒和花生油中的 OTA。②ELISA^[50]。基于单克隆抗体的间接竞争性 ELISA(IC ELISA)技术被用于定量检测玉米青贮饲料中的赭青毒素(Paxilline)和 OTA、稻米稻曲球和水稻籽粒中的稻曲毒素(Ustilotoxin B)。③其他。如免疫亲和柱偶联荧光光度计测定肉制品中的真菌毒素;荧光极化免疫分析(Fluorescence polarization immunoassay)快速筛选啤酒中的黄曲霉毒素 B1。

无论是单克隆抗体、适配体还是免疫亲和柱,均依赖于真菌毒素与其特异性配体之间特异性的相互作用,这也使得免疫化学方法主要适于单个真菌毒素的检测,而对于含多种真菌毒素的复杂样品,则推荐使用色谱方法。最常用的色谱学方法是 LC 偶联 MS 或随机 MS/MS。Serrano 等^[51]使用 LC ESI MS/MS 技术对 65 份稻米样品中的镰刀菌真菌毒素白僵菌素(Beauvericin, BEA)、恩镰孢菌素(Enniatins, ENNs, 分 A、A1、B、B1 4 种组分)、Fusaproliferin 和串珠镰刀菌素(Moniliformin)进行了分析,在 26 份样品中均检测含有 BEA, ENNs 仅检测到了 A1 组分,后两者未检测到。Escriba 等^[40]使用 GC-MS/MS 从鼠饲料中检测到了 7 种单端孢霉烯族毒素,其中 DON 存在最普遍,然而,因为真菌毒素是极性化合物,使用 GC 分析需额外增加衍生化步骤,所以已逐渐被 LC 所取代。

在食品安全评价领域,随着 MS 离子化技术“MALDI-TOF 和 ESI-MS”的不断发展,以轨道阱质谱仪为代表的高

分辨率质谱(High resolution mass spectrometers, HRMS, 分辨率率可高达1万、质量准确度 ≤ 5 mg/kg)将逐渐成为检测食物中真菌毒素的首选方法。Dominicis等^[52]使用UHPLC结合单级轨道阱定量测定了牛奶和小麦粉中的33种真菌毒素、杀虫剂和抗生素;同样的方法还成功测定了谷类中的T2和HT2毒素及其糖基化衍生物,以及玉米中的伏马菌素。在定量检测方面,建议选择同位素稀释(Isotope dilution, ID)LC-MS作为内标(其基于信号比代替信号强度),该方法已被用于检测自制豆瓣酱中的OTA、苹果中的棒曲霉素,甚至人尿液中的TeA。

3 小结与展望

以蛋白质组、肽组、代谢组为代表的各种食物组学技术,为更有效地监控食品生产、运输和存储过程中食源性病原及其毒素的污染提供了强大的技术手段。高通量样品制备方法及MALDI-TOF-MS技术的发展将进一步促进这些技术在常规食品样品分析中的使用。随着轨道阱和傅里叶变换离子回旋MS技术的发展,超高分辨率质谱(Ultra high resolution mass spectrometry, UHRMS)的分辨能力将实现超过10万级别,并进一步促进LC-MS-MS在毒素分析与鉴定疾病生物标记物中的广泛应用。

当然,传统的以免疫化学为代表的微生物及其毒素检测方法,在常规使用中依然存在巨大的潜力可供挖掘,尤其是小型化和新的高通量技术的应用,将进一步降低检测限、减少样品和溶剂用量,同时显著缩短分析时间^[53]。值得一提的是,对于真菌毒素,除了致病威胁外,某些还具有利用价值,如麦角菌属真菌产生的麦角生物碱可作为医药原料生产抗偏头痛药物、催乳激素(Prolactin)抑制剂或抗帕金森病药物,这些方向都值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] REŠETAR D, PAVELIĆ S K, JOSIĆ D. Foodomics for investigations of food toxins[J]. *Curr Opin Food Sci*, 2015, 4: 86-91.
- [2] 曾昆, 杜道林, 薛永来. 基于特异性生物识别分子的黄曲霉毒素快速分析方法研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 47-55.
- [3] SOSPEDRA I, SOLER C, MAÑES J, et al. Analysis of staphylococcal enterotoxin A in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(5): 1525-1531.
- [4] ALAM S I, KUMAR B, KAMBOJ D V. Multiplex detection of protein toxins using MALDI-TOF-TOF tandem mass spectrometry: Application in unambiguous toxin detection from bioaerosol[J]. *Anal Chem*, 2012, 84(23): 10500-10507.
- [5] LIANG M Y, ZHANG T T, LIU X L, et al. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the multiple peptide for the synchronous detection of staphylococcal enterotoxin A and G proteins in milk[J]. *Journal of food protection*, 2015, 78(2): 362-369.
- [6] SOSPEDRA I, SOLER C, MAÑES J, et al. Rapid whole protein quantitation of staphylococcal enterotoxins A and B by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of chromatography A*, 2012, 1238(10): 54-59.
- [7] MURATOVIC A Z, HAGSTROM T, ROSÉN J, et al. Quantitative analysis of staphylococcal enterotoxins A and B in food matrices using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)[J]. *Toxins*, 2015, 7(9): 3637-3656.
- [8] ADRAIT A, LEBERT D, TRAUCHESSE C M, et al. Development of a protein standard absolute quantification (PSAQ™) assay for the quantification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in serum[J]. *Journal of proteomics*, 2012, 75(10): 3041-3049.
- [9] DUPRÉ M, GILQUIN B, FENAILLE F, et al. Multiplex quantification of protein toxins in human biofluids and food matrices using immunoextraction and high-resolution targeted mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8473-8480.
- [10] REDDY P, RAMLAL S, SRIPATHY M H, et al. Development and evaluation of IgY ImmunoCapture PCR ELISA for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A devoid of protein A interference[J]. *Journal of immunological methods*, 2014, 408: 114-122.
- [11] FAGERQUIST C K, ZARAGOZA W J, SULTAN O, et al. Top-down proteomic identification of Shiga toxin 2 subtypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem time of flight mass spectrometry[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(9): 2928-2940.
- [12] SOSPEDRA I, SIMONE C D, SORIANO J M, et al. Characterization of heat-labile toxin-subunit B from *Escherichia coli* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(11): 3886-3891.
- [13] PELLETT S. Progress in cell based assays for botulinum neurotoxin detection[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2013, 364: 257-285.
- [14] KALB S R, BAUDYS J, WANG D, et al. Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples[J]. *Toxins*, 2015, 7(5): 1765-1778.
- [15] HENSBERGEN P J, KLYCHNIKOV O I, BAKKER D, et al. A novel secreted metalloprotease (CD2830) from *Clostridium difficile* cleaves specific proline sequences in LPXTG cell surface proteins[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13: 1231-1244.
- [16] KUKLENYIK Z, BOYER A E, LINS R, et al. Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for endopeptidase activity-based quantification of anthrax lethal factor in serum[J]. *Anal Chem*, 2011, 83(5): 1760-1765.
- [17] MURATOVIC A Z, TRÖGER R, GRANELLI K, et al. Quantitative analysis of cereulide toxin from *Bacillus cereus* in rice and pasta using synthetic cereulide standard and I3C6-cereulide standard: A short validation study[J]. *Toxins*, 2014, 6(12): 3326-3335.
- [18] REDDY P J, RAY S, SATHE G J, et al. A comprehensive proteomic analysis of total induced alterations in *Bacillus subtilis* by multipronged quantitative proteomics[J]. *Journal of proteomics*, 2015, 114: 247-262.
- [19] GAJDOŠIK M Š, GAŠO-SOKA Ć D, PAVLOVI Ć H, et al. Sample preparation and further proteomic investigation of the inhibitory activity of pyridinium oximes to Gram-positive and Gram-negative food pathogens[J]. *Food Res Int*, 2013, 51(1): 46-52.
- [20] ELMI A, WATSON E, SANDU P, et al. Campylobacter jejuni outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(12): 4089-4098.
- [21] MIYAMOTO K N, MONTEIRO K M, CAUMO K D S, et al. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 exposed to a sublethal concentration of nisin[J]. *Journal of proteomics*, 2015, 119: 230-237.
- [22] KANAUIA P K, BAJAJ P, KUMAR S. Proteomic analysis of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A under iron-rich and iron-poor conditions indicate existence of efficiently regulated mechanism of iron homeostasis[J]. *Journal of proteomics* 2015, 124: 39-49.
- [23] IMAMI K, BHAVSAR A P, YU H, et al. Global impact of *Salmonella pathogenicity island 2*-secreted effectors on the host phosphoproteome[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12: 1632-1643.
- [24] ENANY S, YOSHIDA Y, YAMAMOTO T. Exploring extra-cellular proteins in methicillin susceptible and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(4): 1269-1283.
- [25] QUIBLIER C, SEIDL K, ROSCHITZKI B, et al. Secretome analysis defines the major role of SecDF in *Staphylococcus aureus* virulence[J]. *Plos one*, 2013, 8(5): 1-12.
- [26] BRAAKSMA M, MARTENS-UZUNOVA E S, PUNT P J, et al. An inventory of the Aspergillus niger secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 584.
- [27] JI X L, YAN M, YANG Z D, et al. Shotgun analysis of the secretome of *Fusarium graminearum*[J]. *Indian journal of microbiology*, 2013, 53(4): 400-409.
- [28] DE GODOY L M F. SILAC yeast: From labeling to comprehensive proteome quantification[J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1156: 81-109.

- [29] ZHU R Y, ZHAO Z Y, WANG J H, et al. A simple sample pretreatment method for multi-mycotoxin determination in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of chromatography A*, 2015, 1417:1-7.
- [30] LAI X W, SUN D L, RUAN C Q, et al. Rapid analysis of aflatoxins B1, B2, and ochratoxin A in rice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with HPLC [J]. *Sep Sci*, 2014, 37(1/2):92-98.
- [31] BELOGLAZOVA N V, EREMIN S A. Rapid screening of aflatoxin B1 in beer by fluorescence polarization immunoassay [J]. *Talanta*, 2015, 142:170-175.
- [32] CAMPONE L, PICCINELLI A L, CELANO R, et al. A fully automated method for simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits by pressurized liquid extraction and online solid-phase extraction cleanup coupled to ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(10):2899-2911.
- [33] SAITO K, IKEUCHI R, KATAOKA H. Determination of ochratoxins in nuts and grain samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of chromatography A*, 2012, 1220:1-6.
- [34] AL-HADITHI N, KÖSSLER P, KARLOVSKY P. Determination of ochratoxin A in wheat and maize by solid bar microextraction with liquid chromatography and fluorescence detection [J]. *Toxins*, 2015, 7(8):3000-3011.
- [35] AHN S, LEE S, LEE J, et al. Accurate determination of ochratoxin A in Korean fermented soybean paste by isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food chem*, 2016, 190:368-373.
- [36] ZHANG X, SUN M J, KANG Y, et al. Identification of a high-affinity monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Toxicon*, 2015, 106:89-96.
- [37] CHOI S W, CHANG H J, LEE N, et al. A surface plasmon resonance sensor for the detection of deoxynivalenol using a molecularly imprinted polymer [J]. *Sensors*, 2011, 11(9):8654-8664.
- [38] NATHANAIL A V, SYVÄHUOKO J, MALACHOVA A, et al. Simultaneous determination of major type A and B trichothecenes, zearalenone and certain modified metabolites in Finnish cereal grains with a novel liquid chromatography-tandem mass spectrometric method [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(16):4745-4755.
- [39] TAMURA M, MOCHIZUKI N, NAGATOMI Y, et al. Identification and quantification of fumonisin A1, A2, and A3 in corn by high-resolution liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(2):582-592.
- [40] ESCRIVÁ L, MANYES L, FONT G, et al. Analysis of trichothecenes in laboratory rat feed by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 33(2):329-338.
- [41] LATTANZIO V M, CIASCA B, TERZI V, et al. Study of the natural occurrence of T-2 and HT-2 toxins and their glucosyl derivatives from field barley to malt by high-resolution Orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 32(10):1647-1655.
- [42] SEO M, KIM B, BAEK S Y. An optimized method for the accurate determination of patulin in apple products by isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(18):5433-5442.
- [43] ATAR N, EREN T, YOLA M L. A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice [J]. *Food Chem*, 2015, 184:7-11.
- [44] TOLGYESI A, STROKA J. Report on the development of a method for the determination of *Alternaria* toxins and t in wheat, tomatoes juice and sunflower seeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [R]. Luxembourg:European commission, 2014.
- [45] STOEVS D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39(2):794-809.
- [46] KÖPPEN R, RASENKO T, MERKEL S, et al. Novel solid-phase extraction for epimer-specific quantitation of ergot alkaloids in rye flour and wheat germ oil [J]. *Agric Food Chem*, 2013, 61(45):10699-10707.
- [47] PIZZUTTI I R, DE KOK A, SCHOLTEN J, et al. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2014, 129:352-363.
- [48] NGUYEN H H, PARK J, KANG S, et al. Surface plasmon resonance: A versatile technique for biosensor applications [J]. *Sensors (Basel)*, 2015, 15:10481-10510.
- [49] ZHU Z L, FENG M X, ZUO L M, et al. An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in wine and peanut oil [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 65:320-326.
- [50] FU X X, WANG A, WANG X H, et al. Development of a monoclonal antibody-based icELISA for the detection of ustiloxin B in rice false smut balls and rice grains [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(9):3481-3496.
- [51] SERRANO A B, CAPRIOTTI A L, CAVALIERE C, et al. Development of a rapid LC-MS/MS method for the determination of emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin in human biological fluids [J]. *Toxins (Basel)*, 2015, 7(9):3554-3571.
- [52] DOMINICIS E D, COMMISSATI I, GRITTI E, et al. Quantitative targeted and retrospective data analysis of relevant pesticides, antibiotics and mycotoxins in bakery products by liquid chromatography-single-stage Orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2015, 32(10):1617-1627.
- [53] 翟绪昭, 王广彬, 赵亮涛, 等. 高通量生物分析技术及应用研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(6):38-46.

(上接第 98 页)

- [12] MOMOSE Y, MATSUMOTO R, MARUYAMA A, et al. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Cryobiology*, 2010, 60(3):245-261.
- [13] STREIT F, CORRIEU G, BÉAL C. Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus sdelbrueckii* subsp. *bulgaricus* CFL1 [J]. *Journal of biotechnology*, 2007, 128(3):659-667.
- [14] 刘变芳, 雒丹, 石磊. 乳酸菌的分离筛选及其微生态制剂的制备 [J]. *中国酿造*, 2011, 30(10):90-94.
- [15] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] 李宝坤. 乳酸杆菌冷冻干燥生理损伤机制及保护策略的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [17] 朱琳, 刘宁, 张英华, 等. 乳酸菌细胞膜的冻干损伤 [J]. *食品科学*, 2006, 27(2):266-269.
- [18] BOSMANS G M, LAGRAIN B, DELEU L J, et al. Assignments of proton populations in dough and bread using NMR relaxometry of starch, gluten, and flour model systems [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2012, 60(21):5461-5470.
- [19] RIBOTTA P D, LEÓN A E, AÓPÑ M C. Effect of freezing and frozen storage of doughs on bread quality [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001, 49(2):913-918.