

王玉波,邓炜杰,陈薪竹,等. 抗呋喃唑酮代谢物衍生物单链抗体-AP酶融合蛋白表达条件优化[J]. 江苏农业科学,2022,50(20):212-216,252. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.20.032

# 抗呋喃唑酮代谢物衍生物单链抗体-AP酶融合蛋白表达条件优化

王玉波<sup>1</sup>, 邓炜杰<sup>1</sup>, 陈薪竹<sup>2</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 洪艳平<sup>1</sup>, 熊建华<sup>1</sup>, 戴棚<sup>1</sup>, 杨武英<sup>1</sup>

(1. 南昌市中农产品加工与质量控制重点实验室/江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330045;

2. 四川百利药业有限责任公司, 四川成都 610041)

**摘要:**为提高抗呋喃唑酮代谢物衍生物单链抗体-碱性磷酸酶融合蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达量。采用液体培养基发酵培养能表达出目的蛋白的基因工程菌,对诱导表达得到的目标融合蛋白进行鉴定,探讨5种培养基、6种诱导时间和4种诱导剂-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)浓度对融合蛋白表达的影响,再通过N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧基琼脂糖凝胶柱和直接竞争酶联免疫分析法进行纯化并对其活性进行鉴定。结果表明,最适宜条件为SB培养基,诱导剂IPTG浓度为0.6 mmol/L,培养9 h,该条件下抗呋喃唑酮代谢物衍生物单链抗体-AP融合蛋白的表达效果较好,表达量从2.89%增加到5.75%,总体增加了约2.86个百分点,通过NHS活化羧基琼脂糖凝胶柱纯化后融合蛋白的浓度为1.973 mg/mL,IC<sub>50</sub>值为56.923 1 ng/mL。本试验单链抗体在大肠杆菌中的可溶性表达量得到了很好的提高,并获得生物活性较好的融合蛋白,为后续呋喃唑酮代谢物免疫检测分析方法的建立奠定了一定基础。

**关键词:**呋喃唑酮代谢物;单链抗体;融合蛋白;蛋白表达条件优化

**中图分类号:**S859.84 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)20-0212-05

呋喃唑酮类人工合成抗生素是一组高效但禁用的兽药,它的原药及其代谢产物3-氨基-2-噁唑烷酮(AOZ)对人体具有致癌、致畸、致突变的特性<sup>[1-2]</sup>。检测呋喃唑酮原药并不有效,因为该药物在摄入后会迅速代谢,而其代谢产物AOZ在体内与细胞蛋白质结合,形成有毒的代谢物-蛋白质加合物,在生物体内长期稳定存在,对人类健康造成危害<sup>[3-5]</sup>。因此把呋喃唑酮代谢物AOZ作为检测动物组织中目标物,比检测其本体更有意义<sup>[6-7]</sup>。目前呋喃唑酮药物及其代谢物残留检测常用仪器分析法和免疫分析法。仪器分析方法主要有液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[8-11]</sup>、高效液相色谱法(HPLC-

UV)<sup>[12-14]</sup>。仪器分析法具有高灵敏度和高精度,但操作复杂、仪器昂贵、耗时成本高,难以实现现场快速检测;相反,免疫分析法及设备操作简单,耗时短,高效,还具有较高的敏捷性和特异性,可现场检测,适用于复杂基质中痕量组分的分析,同时,弥补了仪器分析法技术的不足。因此,近年来,免疫分析法不仅在食品检测中得到了迅速发展,在呋喃唑酮代谢物AOZ残留检测中也有一定研究和应用<sup>[15-18]</sup>。

传统多克隆抗体和单克隆抗体的制备需从抗原、包被原的合成开始,其间会用到大量的化学试剂,对操作者的健康产生危害,而且还需要对动物进行免疫,细胞融合耗费较多的时间。基因工程方法把抗体的制备提高到新的高度,摆脱了传统抗体制备的繁琐和复杂,不需要通过细胞杂交,直接在分子水平进行研究,完善传统抗体制备的方法,弥补其不足,提高并扩大了抗体的应用范围<sup>[19-22]</sup>。单链抗体(scFv)是近年来流行的一种新型基因工程抗体,仅含抗体重链(VH)和轻链(VL),由一条单一肽链连接而成。scFv具有体积小、特异性和亲和力高、免疫原性低、基因工程能力强等优点,且抗体生产周期短、成本低,可在细菌表达系统中进行快速大规模制备。因此,scFv近年在各个领域得到广泛应用,尤其是在农兽药残留免疫检测方面<sup>[23-26]</sup>。

收稿日期:2021-10-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:31660486);江西省自然科学基金面上项目(编号:20202BABL205021);江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ190218);江西省研究生创新专项资金(编号:YC2020-S240);江西省大宗淡水鱼产业技术体系项目(编号:JXARS-3)。

作者简介:王玉波(1995—),男,贵州铜仁人,硕士研究生,研究方向为食品质量与安全。E-mail:3270295118@qq.com。

通信作者:杨武英,博士,教授,主要从事食品质量与安全研究。E-mail:yangwuyi2003@163.com。

scFv 可以与碱性磷酸酶 (AP) 偶联形成融合蛋白, 该蛋白具备 scFv 分子生物活性和 AP 酶活性, 酶标二抗在检测实际样品时被删减, 有利于缩短试验时间、节省成本, 减少生物试剂对操作者健康的危害。

本研究室在前期工作中已经成功构建得到抗 AOZ 衍生物单链抗体 (AOZscFv) 基因, 并把 AOZscFv 基因转入到可溶性表达载体 plip6/GN 中和碱性磷酸酶基因进行融合表达, 但是发现表达量偏低<sup>[27]</sup>。本试验首先测定抗 AOZ 衍生物 scFv 基因工程宿主菌生长曲线, 然后经过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 和蛋白质免疫印迹 (Western - blotting) 分析鉴定后, 通过探讨 5 种培养基、6 种诱导时间、4 种 IPTG (诱导剂 - 异丙基硫代半乳糖苷) 浓度对融合蛋白表达的影响, 来提高大肠杆菌中融合蛋白的表达量, 然后利用 NHS 活化羧基琼脂糖凝胶柱对该融合蛋白进行亲和层析纯化, 采用直接竞争酶联免疫分析法 (dcELISA) 检测该融合蛋白的生物活性, 为后期抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白大量生产和呋喃唑酮代谢物 AOZ 在动物性食品中残留免疫快检的建立奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

试验时间为 2021 年 3 月, 试验地点为江西农业大学食品科学与工程学院农产品加工与质量控制重点实验室。

试验菌种: BL21 (DE3) [BL21 (DE3) 是含有噬菌体 T7 RNA 聚合酶溶原的 BL21 菌株, 适用于含有依赖 T7 RNA 聚合酶转录的启动子的载体] 购自北京全式金生物有限公司, 抗 AOZ 衍生物 scFv 阳性基因工程宿主菌 plip6/GN - scFv/BL21 由本实验室制备保存。

试剂: SDS - PAGE 凝胶制备试剂盒、凝胶蛋白染色液 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; 蛋白 Marker、2xSDS 上样缓冲液、诱导表达剂 IPTG、PEG10000、5000DNA Marker (北京索莱宝科技有限公司); 蛋白胨、酵母提取物均 (英国 OXOID 公司)、NHS 活化羧基琼脂糖凝胶柱 (GE 公司); 底物溶液对硝基苯磷酸二钠 (北京百灵威科技有限公司)。

主要仪器设备: 智能生化培养箱、恒温培养振荡器、智能超净工作台 (江苏迅迪仪器科技有限公司); 蛋白电泳仪、酶标仪 (美国 BIO - RAD 公司)、超微量核酸分析仪 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

### 1.2 试验方法

1.2.1 抗 AOZ 衍生物 scFv 基因工程宿主菌生长曲线的测定 将本研究室构建并冷冻保存的抗 AOZ 衍生物 scFv 阳性基因工程宿主菌 plip6/GN - scFv/BL21 复苏培养, 按 5% 的接种量转接至 15 mL 刚刚配置好的含氨苄青霉素 (Amp, 100 μg/mL) 的 LB 培养基 (Luria - Bertani) 中, 每隔 2 h 测其  $D_{600\text{nm}}$  值, 检测至 18 h 即可, 每次做 3 个平行试验, 计算数据并绘制生长曲线。

1.2.2 单链抗体的表达鉴定 复苏培养的菌液, 在 50 mL LB - Amp 培养基中转接 10% 接种量, 将培养基置于 37 °C 下培养, 直至 600 nm 波长处吸光度保持在 0.6 ~ 0.8 的范围内, 加入诱导剂 (IPTG) 50 μL, 使培养基最终浓度为 0.6 mmol/L; 再将培养基置于转速为 180 r/min、温度为 28 °C 的摇床上, 培养 7 h 后, 采用超声对 AOZscFv - AP 融合蛋白进行提取<sup>[28]</sup>, 最后, 利用 SDS - PAGE 和 Western - blotting 分析鉴定, 同时设空载体为空白对照。

1.2.3 最适培养基的选择 复苏培养的菌液分别采用 2 × YT 培养基 (2 × YT medium)、TB 培养基 (terrific broth)、SB 培养基 (super broth)、LB 培养基、SOB 培养基 (super optimal broth) 5 种培养基进行培养, 然后分别加入诱导剂 IPTG, 以 28 °C、280 r/min 摇床培养 7 h 后, 收集菌体, 对表达的目的蛋白进行超声提取, 再通过 SDS - PAGE 蛋白质凝胶电泳查看不同培养基下抗体蛋白的表达情况。

1.2.4 诱导表达时间的选择 复苏培养的菌液, 接种至上述优选出的最适培养基后进行摇床培养, 加入诱导剂 IPTG, 再用 28 °C、280 r/min 分别诱导 5、6、7、8、9、10 h, 收集菌体, 对表达的目的蛋白进行超声提取, 再利用 SDS - PAGE 蛋白质凝胶电泳分析 6 种诱导时间下抗体蛋白的表达情况。

1.2.5 IPTG 浓度的选择 在上述优选出的最适培养基和最佳诱导表达时间下, 在菌液中分别加入不同质量的诱导剂 IPTG 使其终浓度分别为 0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L, 用 28 °C、280 r/min 诱导表达, 收集菌体, 对表达的目的蛋白进行超声提取, 通过 SDS - PAGE 蛋白质凝胶电泳查看不同 IPTG 浓度下抗体蛋白的表达情况。

1.2.6 抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白的纯化 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 将包被抗原 AOZ - COOH - OVA 稀释至 1 mg/mL, 4 °C 冰箱备用。取 NHS 活化羧基琼脂糖凝胶柱填料 1 mL 加入到层析柱中, 用

0.1 mol/L HCl 洗涤填料,然后加入稀释好的抗原溶液,置于 4 °C 冰箱过夜。次日收集抗原溶液,用 2 mL 封闭缓冲液封闭 2 h,弃掉封闭缓冲液后,用缓冲液 A 和缓冲液 B 反复交替洗涤填料至少 6 次,随后将填料储存于 PBS 缓冲液中,备用。将处理好的纯化柱取出,弃掉 PBS 后,加入浓缩的抗 AOZ 衍生物 scFv 融合蛋白超声波破碎提取液进行亲和吸附,用 PBS 反复平衡柱子,加入甘氨酸盐酸(Gly - HCl)洗脱 scFv 蛋白,并立即用三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris - HCl)中和蛋白,使用聚乙二醇 10000(PEG10000)浓缩,通过 SDS - PAGE 蛋白质凝胶电泳查看结果,并用超微量核酸分析仪测定纯化后融合蛋白的浓度。

1.2.7 抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白的活性检测 采用直接竞争酶联免疫分析法(dcELISA)对纯化后的 scFv - AP 融合蛋白进行活性检测。在酶标板里加入一定稀释浓度(100  $\mu$ L/孔)的包被抗原 AOZ - COOH - OVA,于 4 °C 冰箱下保存过夜;取出酶标板后弃去包被液,加入磷酸盐吐温缓冲液(PBST)220  $\mu$ L/孔,振荡 20 s,洗涤 3 次,再加入 220  $\mu$ L/孔 1% BSA - PBS(封闭液),于 37 °C 条件下静置 1 h;弃液,加入 PBST 220  $\mu$ L/孔,振荡 20 s,洗涤 3 次,在 37 °C 下烘干 30 min 后,分别加入 7 个标准药物 3 - (2 - 硝基亚苄基氨基)咪唑烷酮(NPAOZ)浓度梯度于酶标板的前 7 个孔,接着加稀释过后的抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白 50  $\mu$ L,将酶标板放置于 37 °C 下,孵育 45 min,每孔加入 220  $\mu$ L PBST,振荡 20 s,洗涤 6 次;加入 100  $\mu$ L 对硝基苯磷酸二钠(TMB)底物溶液,于水浴中显色 15 min,最后加入终止液(10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)50  $\mu$ L 终止反应,于 405 nm 波长处用酶标仪测定吸光度,计算并绘制标准曲线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗 AOZ 衍生物 scFv 基因工程宿主菌生长曲线的测定

将基因工程菌 plip6/GN - scFv/BL21(DE3) 和对照菌株 BL21(DE3) 复苏、扩大培养后,每 2 h 于 600 nm 波长处测定其吸光度,以  $D_{600\text{nm}}$  值为纵坐标,培养时间为横坐标绘制生长曲线,结果见图 1,培养 0 ~ 16 h 时,基因工程菌与对照菌的生长趋势随着时间的延长而上升;16 h 后,生长缓慢,且二者的生长趋势基本一致。说明该外源基因没有对宿主菌

BL21(DE3) 的生长代谢带来干扰和负担,因此,宿主菌 BL21(DE3) 适合表达该外源基因。

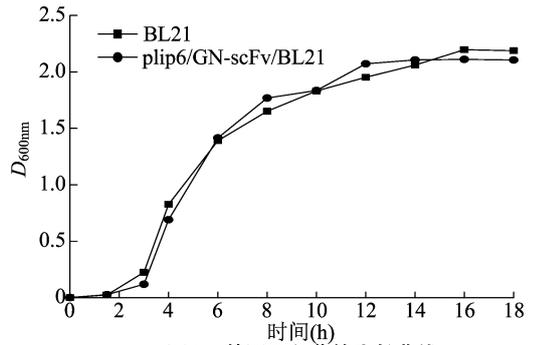


图1 基因工程菌的生长曲线

### 2.2 单链抗体的表达鉴定

基因工程菌培养液加入 IPTG 后,采用超声破碎法对诱导表达得到的 AOZscFv - AP 融合蛋白进行提取,并利用 SDS - PAGE (A) 和 Western - blotting(B) 对融合蛋白进行鉴定,结果见图 2。AOZ 单链抗体蛋白和 AP 酶分子量范围分别为 20 ~ 30、50 ~ 60 ku,综合 2 个分子量的范围可以判断出融合蛋白分子量在 70 ku 左右。在 SDS - PAGE 鉴定图的泳道 2 处出现一条新生蛋白带,约为 55 ~ 72 ku,确定该条带就是 AOZscFv - AP 融合蛋白,Western - blotting 鉴定图也在 55 ~ 72 ku 出现很明显条带,再次确定该条带为 AOZscFv - AP 融合蛋白。

### 2.3 抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白在不同培养基中表达量的变化

在其他条件最适宜的情况下,菌体的生长和蛋白的表达均随培养基发生改变受到一定程度的影响<sup>[29]</sup>,通常情况下,营养成分较高的培养基使细菌的生长更加快速。根据融合蛋白培养基对营养的需要,培养基必须既能提供微生物生长繁殖的外部生存环境,又能满足细胞对营养和能量基础物质的需求,因此,研究抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白在 5 种培养基中表达量的变化,结果见图 3,经 2 × YT、TB、SB、LB、SOB 培养的基因工程菌 plip6/GN - scFv/BL21(DE3) 诱导和用 Quantity one 4.6.6 分析可知,5 种培养基表达的蛋白量分别为 3.06%、3.40%、4.33%、3.06%、3.77%,其中 SB 培养基表达的蛋白量最高,说明 SB 培养基更适合表达抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白。

### 2.4 抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白在不同诱导时间下表达量的变化

刘佳璐等研究表明,IPTG 诱导剂可使蛋白质得到持续表达,且蛋白表达量直接受到 IPTG 诱导时

间的影响,诱导时间不足会导致蛋白表达量偏少,表达时间过长则会产生不必要的经济损失<sup>[30]</sup>。为了研究融合蛋白的表达量在不同诱导时间段下的变化,试验设置6个诱导时间分析其表达量的不同。

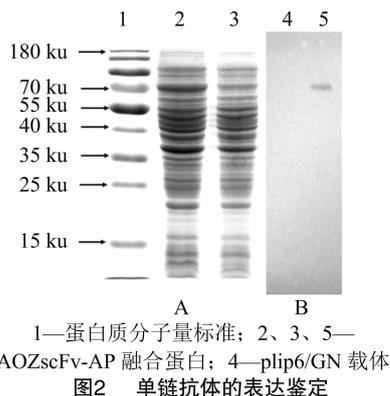


图2 单链抗体的表达鉴定

## 2.5 抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白在不同浓度诱导剂下表达量的变化

由于 IPTG 具有一定的毒性,当其自身浓度过高时,会具有高毒性,破坏菌体的生长,同时也不利于操作者的健康与节约成本<sup>[31]</sup>。本试验设置4个诱导剂浓度进行试验。结果见图5,当诱导剂 IPTG 浓度为0.6 mmol/L 时,蛋白质的提取表达效果优于其他4个浓度,软件 Quantity one 4.6.6 分析其蛋白表达量高达5.82%。因此,0.6 mmol/L 的 IPTG 最适合诱导表达。

综上所述,最适宜的条件为 SB 培养基,0.6 mmol/L IPTG,培养9 h。经软件 Quantity one V4.6.6 分析得到该条带的表达水平达5.75%,比表达条件优化前的表达量(2.89%)增加了约2.86个百分点,有效提高了表达量<sup>[27]</sup>。

## 2.6 融合蛋白的纯化

将样品过纯化柱后,用0.1 mol/L HCl 进行洗脱,洗脱液通过 PEG10000 浓缩,再用 SDS - PAGE 分析。结果如图6所示,经过 NHS 活化羧基琼脂糖

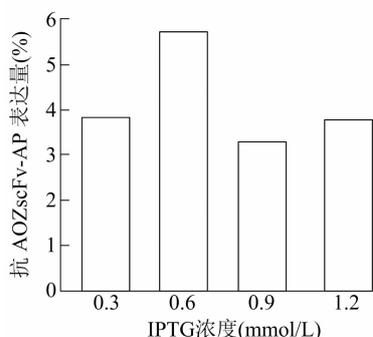


图5 不同 IPTG 诱导剂浓度对抗 AOZscFv-AP 融合蛋白表达量的影响

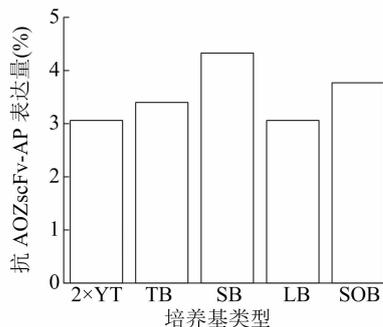


图3 不同培养基下 AOZscFv-AP 融合蛋白表达量

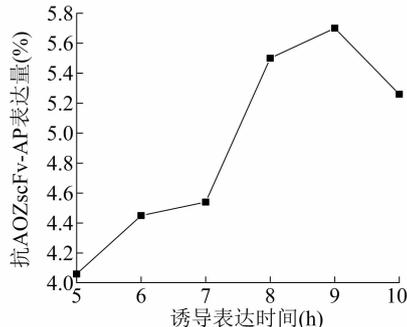


图4 不同诱导表达时间对抗 AOZscFv-AP 融合蛋白表达量的影响

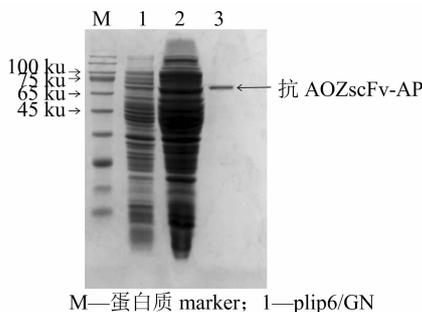
凝胶柱纯化再浓缩后得到的抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白条带单一、纯度高,其融合蛋白的浓度为1.973 mg/mL,表明该融合蛋白纯化效果良好。

## 2.7 融合蛋白的活性鉴定

采用 dcELISA 的分析方法检测“2.6”节中融合蛋白的活性,以 NPAOZ 标准溶液浓度梯度的对数为  $x$  轴, $D/D_0$  为  $y$  轴(在405 nm 波长下, $D$  表示标准药物浓度梯度的吸光度, $D_0$  表示空白的吸光度)绘制标准曲线(图7)。通过拟合计算得到50%抑制率( $IC_{50}$ )值为56.923 1 ng/mL。这说明在本试验选取的表达条件下进行诱导表达得到的抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白具有较好的生物活性。

## 3 结论

抗呋喃唑酮代谢物衍生物 scFv 的基因工程菌 plip6/GN - scFv/BL21 (DE3) 和对照菌株 BL21 (DE3) 生长曲线结果表明,外源 scFv 基因适合通过宿主菌 BL21 (DE3) 进行表达。前期工作中发现抗 AOZ 衍生物 scFv - AP 融合蛋白在大肠杆菌中的表



M—蛋白质 marker; 1—plip6/GN 空载体对照组; 2—杂蛋白; 3—抗 AOZscFv-AP 融合蛋白

图6 融合蛋白的纯化

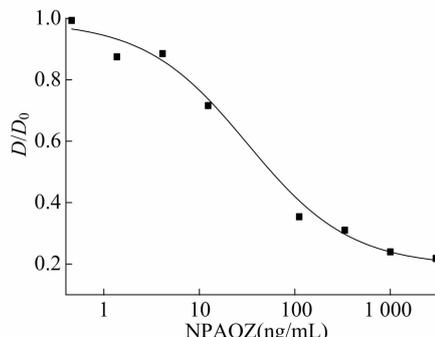


图7 NPAOZ 的 dcELISA 标准曲线

达量偏低,仅为胞内可溶性表达,目的蛋白只存在于细胞周质腔空间中,培养基上清中未发现目的蛋白,须要采用超声波破碎法才能从周质腔空间中释放提取出目的蛋白,因此本研究提取目的蛋白时采用超声波破碎法,有效优化了表达条件。通过对诱导表达并超声波破碎法提取得到的抗 AOZ 衍生物 scFv-AP 融合蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western-blotting 鉴定可知,新生蛋白带出现在 55~72 ku 之内,确定该条带就是抗 AOZscFv-AP 融合蛋白。本试验抗 AOZ 衍生物 scFv-AP 融合蛋白在 5 种培养基、6 种诱导时间和 4 种 IPTG 浓度的条件下,对融合蛋白在大肠杆菌中胞内可溶性表达进行了优化,结果表明,最适宜的条件为 SB 培养基,0.6 mmol/L IPTG,培养 9 h,该条件下抗 AOZ 衍生物 scFv-AP 融合蛋白的表达效果较好,表达量从 2.89% 增加到 5.75%,总体增加了约 2.86 个百分点。本试验采用 NHS 活化羧基琼脂糖凝胶柱对提取得到的蛋白进行亲和层析纯化,纯化后浓缩的融合蛋白的浓度为 1.973 mg/mL,同时 dcELISA 的 IC<sub>50</sub> 值为 56.923 1 ng/mL,表明在最佳表达条件下得到的融合蛋白经纯化后具有较好的生物活性,为后期抗 AOZ 衍生物 scFv-AP 融合蛋白大量生产制备和呋喃唑酮代谢物 AOZ 在动物性食品中残留免疫快检的建立奠定基础。

#### 参考文献:

[1] Cheng C C, Hsieh K H, Lei Y C, et al. Development and residue screening of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in cultured fish by an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(13): 5687-5692.

[2] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry - In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1/2): 336-347.

[3] McCracken R J, Kennedy D G. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1997, 771(1/2): 349-354.

[4] Leitner A, Zöllner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 939(1/2): 49-58.

[5] 刘宇. 呋喃唑酮在猪体内生理药动学模型研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.

[6] Zhang S W, Shen Y D, Sun Y M. Monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay for furazolidone in feed [J]. *Analytical Letters*, 2010, 43(17): 2716-2729.

[7] Chang C, Peng D P, Wu J E, et al. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of furazolidone marker residue in animal edible tissues [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(5): 1525-1531.

[8] 辛少平, 邓建朝, 杨贤庆, 等. 高效液相色谱法测定硝基呋喃类药物代谢物及其在对虾体内的代谢[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 151-157.

[9] Yu W H, Chin T S, Lai H T. Detection of nitrofurans and their metabolites in pond water and sediments by liquid chromatography (LC)-photodiode array detection and LC-ion spray tandem mass spectrometry [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85: 517-526.

[10] 高文惠, 王姣姣, 贾英民. 分子印迹固相萃取-液相色谱法测定食品中硝基呋喃类药物残留[J]. *中国食品学报*, 2014, 14(9): 183-189.

[11] Du N N, Chen M M, Sheng L Q, et al. Determination of nitrofurans metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1327: 90-96.

[12] Zhang Y B, Qiao H O, Chen C, et al. Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 612-617.

[13] Wang K, Lin K D, Huang X W, et al. A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(24): 5064-5073.

[14] Wu S Y, Yang B H, Yu H Q, et al. A rapid derivatization method for analyzing nitrofurans metabolites in fish using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2020, 310: 125814.

[15] 柳爱春, 刘超, 赵芸, 等. 免疫胶体金法快速检测水产品中硝基呋喃类代谢物的研究[J]. *浙江农业学报*, 2013, 25(1): 95-102.

[16] Le T, Yu H. Determination of 3-amino-2-oxazolidinone in animal tissue by an enzyme-linked immunosorbent assay and a time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(8): 1275-1284.

[17] Xie Y, Zhang L, Le T. An immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in animal tissues [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(3): 403-413.

[18] 黄登宇, 高文静, 黄种乾, 等. 呋喃唑酮代谢物间接竞争化学发光酶免疫法的建立[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(9): 294-299.

[19] Shu M, Xu Y, Dong J X, et al. Development of a noncompetitive idiometric nanobodies phage immunoassay for the determination of fumonisin B<sub>1</sub> [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1):

- plants[J]. Australian Journal of Soil Research,1997,35(2):227-240.
- [4] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. Biotechnology Advances,1999,17(4/5):319-339.
- [5] 江红梅. 真菌溶磷相关基因的克隆与功能验证[D]. 北京:中国农业科学院,2018.
- [6] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001(3):7-11.
- [7] Narsian V, Patel H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry,2000,32(4):559-565.
- [8] Whitelaw M A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi[J]. Advances in Agronomy,1999,69:99-151.
- [9] 李露莉, 邱树毅, 王义娟, 等. 一株黑曲霉转化低品位磷矿能力的研究[J]. 中国农学通报,2010,26(20):335-338.
- [10] 梁艳琼, 雷照鸣, 贺春萍, 等. 一株溶磷真菌的分离鉴定及其溶磷能力的初步研究[J]. 热带作物学报,2011,32(6):1116-1121.
- [11] 张丽珍, 樊晶晶, 牛伟, 等. 盐碱地柠条根围土中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定[J]. 生态学报,2011,31(24):7571-7578.
- [12] 张建峰, 苗天瑶, 张嘉旭, 等. 1株溶磷真菌的分离鉴定及溶磷特性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(12):121-128.
- [13] 范延辉, 王君, 刘雪红, 等. 一株耐盐解磷真菌的筛选、鉴定及其发酵优化[J]. 土壤通报,2015,46(2):362-367.
- [14] 乔欢, 吴小芹, 王早. 一株嗜松青霉 JP-NJ4 的解磷特性[J]. 微生物学通报,2014,41(9):1741-1748.
- [15] Lugo M A, Reinhart K O, Menoyo E, et al. Plant functional traits and phylogenetic relatedness explain variation in associations with root fungal endophytes in an extreme arid environment[J]. Mycorrhiza,2015,25(2):85-95.
- [16] 詹寿发, 樊有斌, 甘金莲, 等. 1株山药内生真菌的鉴定及解磷活性[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):320-323.
- [17] 孙合美, 王春红, 卢冬雪, 等. 土壤溶磷微生物及其对植物促进作用研究进展[J]. 河南农业科学,2016,45(5):1-6.
- [18] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology,2006,34(1):33-41.
- [19] 杜春梅, 金术超, 王葳, 等. 无机磷分解菌 BL-11 的鉴定及其解磷能力研究[J]. 微生物学通报,2007,34(2):283-286.
- [20] Hameeda B, Reddy Y H K, Rupela O P, et al. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna[J]. Current Microbiology,2006,53:298-302.
- [21] 王欢, 王敬敬, 徐松, 等. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J]. 微生物学报,2017,57(5):667-680.
- [22] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms[J]. Soil Biology and Biochemistry,1995,27(3):257-263.
- [23] Sokolski S, Dalpé Y, Piché Y. Phosphate transporter genes as reliable gene markers for the identification and discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi in the genus *Glomus*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2011,77(5):1888-1891.
- [24] 李凤霞, 梁锦绣, 周涛. 宁夏产枸杞根际溶磷菌分离及溶磷能力分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):29-32.
- [25] 冯瑞章, 姚拓, 周万海, 等. 溶磷菌和固氮菌溶磷矿粉时的互作效应[J]. 生态学报,2006,26(8):2764-2769.
- [26] 冯宏, 李永涛, 张志红, 等. 类芦根际溶磷真菌的筛选、鉴定及其溶磷能力分析[J]. 微生物学通报,2010,37(5):677-681.
- [27] 杨榕, 王敬敬, 徐松, 等. 溶磷真菌的筛选及耐盐特性分析[J]. 微生物学通报,2018,45(10):2142-2151.
- [28] 向文良, 冯玮, 郭建华, 等. 一株解磷中度嗜盐菌的分离鉴定及解磷特性分析[J]. 微生物学通报,2009,36(3):320-327.

(上接第216页)

510-521.

- [20] Yang W Y, Wang H, Dong J X, et al. Cloning, expression, purification, and characterization of a novel single-chain variable fragment antibody against the 2-nitrobenzaldehyde derivative of a furaldone metabolite in *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification,2012,84(1):140-146.
- [21] 何婷. 黄曲霉毒素纳米抗体研制及其免疫分析技术研究[D]. 北京:中国农业科学院,2016.
- [22] Wang X X, He Q H, Xu Y, et al. Anti-idiotypic VHH phage display-mediated immuno-PCR for ultrasensitive determination of mycotoxin zearalenone in cereals[J]. Talanta,2016,147:410-415.
- [23] 杨武英, 王弘, 洪艳平, 等. 咪喃它酮代谢物单链抗体制备和酶联免疫分析方法[J]. 食品科学,2020,41(24):251-258.
- [24] 杨武英, 董洁娟, 沈玉栋, 等. 虾肉中咪喃它酮代谢物化学发光酶免疫分析方法的建立[J]. 分析化学,2012,40(12):1816-1821.
- [25] 伍伟健, 董洁娟, 饶美芳, 等. 抗孔雀石绿单链抗体-碱性磷酸酶融合表达和活性鉴定[J]. 食品科学,2016,37(17):121-126.
- [26] Xu Z L, Dong J X, Wang H, et al. Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of O,O-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2012,60(20):5076-5083.
- [27] 陈薪竹, 王玉波, 王丹, 等. 抗咪喃它酮代谢物单链抗体基因构建及蛋白结构分析和活性鉴定[J]. 食品科学,2021,42(24):67-73.
- [28] 陈冬年, 刘展, 武绍华, 等. 超声波辅助法提取小龙虾甲壳素[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):236-238.
- [29] Haque M A, Imam H, Hana H K, et al. Maintenance and optimization of culture/fermentation media to achieve maximum bioactive metabolites from marine *Streptomyces* sp. and their cytotoxic effects[J]. Indian Journal of Geo-Marine Sciences,2017,46(1):170-175.
- [30] 刘佳璐, 郑维, 范若辰, 等. 金黄色葡萄球菌 SaeP 蛋白表达条件的优化[J]. 中国乳品工业,2020,48(1):14-17,22.
- [31] 孟婷, 郑志明, 王永娟, 等. 抗四环素单链抗体基因表达及免疫学活性检测[J]. 畜牧与兽医,2018,50(7):57-59.