

新型青霉素结合蛋白基因(*Bt-pbp2*)的克隆、表达及其在青霉素残留检测中的应用

鞠守勇

(武汉职业技术学院生物工程学院,湖北武汉 430074)

摘要:从苏云金芽胞杆菌中克隆到一种新型的青霉素结合蛋白基因 *Bt-pbp2*,并在大肠杆菌中表达该蛋白,通过微量热泳动仪(MST)证实该蛋白与青霉素 G 有特异相互作用,其 Kd 值为 10.36 nmol/L,利用该蛋白与青霉素 G 特异性相互作用,设计了竞争性酶联法检测牛奶中青霉素 G 残留的方法。研究表明,该方法当青霉素 G 浓度在 4~256 $\mu\text{g/L}$ 之间时,浓度与吸光度有线性关系,其添加回收率在 93.4% \pm 5.24% 以上。研究表明,*Bt-PBP2* 蛋白可以用于检测牛奶中青霉素残留,为进一步开发快速、高效青霉素残留检测试纸条设计奠定了基础。

关键词:青霉素,青霉素结合蛋白,青霉素残留

The cloning and expression of novel penicillin binding protein (*Bt-pbp2*) and application in detection of penicillin residues

JV Shou-yong

(School of Bioengineering, Wuhan Polytechnic, Wuhan 430074, China)

Abstract: The penicillin binding protein gene from *Bacillus thuringiensis* (*Bt-pbp2*) was cloned and expressed in the host *E. coli*. Protein *Bt-PBP2* extracted from *E. coli* was confirmed to have interaction with the penicillin G using the Microscale Thermophoresis (MST) technology. The equilibrium dissociation constant between *Bt-PBP2* and penicillin G (Kd value), was 10.36 nmol/L. The competitive enzyme-linked method of detection and determination of penicillin residues in Cow Milk was established according to the interaction between protein *Bt-PBP2* and penicillin. Using the method, the dose-dependent linear relationship is evident between the absorbance (A450) and the concentration of penicillin G in the range of 4~256 $\mu\text{g/L}$. The average adding recovery rate of this method was above 93% \pm 5.24%. This research showed that protein *Bt-PBP2* is capable of detecting the penicillin residues in cow milk, and laid the foundations for the highly efficient test strip for the detection of penicillin residues.

Key words: penicillin; penicillin binding protein; penicillin residues

中图分类号: TS252.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)08-0126-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.08.023

引文格式: 鞠守勇. 新型青霉素结合蛋白基因 (*Bt-pbp2*) 的克隆、表达及其在青霉素残留检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(6): 126-129, 140.

青霉素类(β -内酰胺类)抗生素是我国畜牧业生产中使用最普及的一类抗生素,畜产品中青霉素类抗生素残留越来越引起人们的关注。长期摄入含有青霉素类抗生素残留的食品将破坏人体胃肠道等菌群的平衡,引起腹泻等症状;一部分对青霉素过敏人群长期食用青霉素超标的食物将引发过敏反应,轻者导致发热、关节肿痛等症状,严重时甚至引起呼吸困难、休克甚至危及生命^[1]。2008年10月9日,国务院通过了《乳品质量安全监督管理条例》(国务院令 第536号),将抗生素残留检测项目列为强制性检

测项目,并规定了各类抗生素在牛乳中的最高残留限量。目前,牛奶和奶粉中青霉素残留国家标准检测方法为2008年12月31日发布的《GB/T 22975-2008 牛奶和奶粉中阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林和双氯西林残留量的测定液相色谱-串联质谱法》,这种方法虽然具有灵敏度高、准确度高等优点,但该方法需要的仪器设备昂贵,样品前处理过程繁琐。

青霉素结合蛋白 (penicillin binding proteins, PBP) 一般位于细菌细胞膜上,因为最初发现能和青

收稿日期: 2017-09-08

作者简介: 鞠守勇(1981-),男,博士,副教授,主要从事农业微生物方面的研究, E-mail: jushouyong@mail.hazu.edu.cn。

基金项目: 湖北省高等学校优秀中青年科技创新团队计划项目(T201535);武汉职业技术学院博士科研基金项目(2016BS005);湖北省教育厅科技 B 类项目(B2016583)。

霉素共价结合而得名。青霉素类(β -内酰胺类)抗生素的结构类似于肽聚糖合成前体物 D-Ala-D-Ala, 这类抗生素能专一性地与细菌的 PBP 结合, 抑制 PBP 酶的活性, 干扰细胞壁肽聚糖的合成, 最终杀死细菌^[2-3]。根据 PBP 的相对分子质量大小及催化活性不同, 可以将 PBP 分为 PBP1、PBP2、PBP3 等三大类^[4]。青霉素免疫检测法利用青霉素结合蛋白与青霉素类抗生素的特异性相互作用和酶的高效催化反应达到快速检测食品中青霉素残留的目的, 该方法操作简单、成本低廉、检测灵敏高、准确快速^[5-7], 越来越多的用于食品中抗生素及毒素残留的检测^[6,8], 这种检测方法的核心就是与青霉素类抗生素特异性结合的 PBP 蛋白。近几年, 已经从多种微生物中克隆到不同类型的青霉素结合蛋白, 例如革兰氏阳性菌中的肺炎链球菌、革兰氏阴性菌中大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和淋病奈瑟氏菌等。但是, 目前克隆得到的 PBP 与 β -内酰胺类抗生素的结合能力特异性结合能力比较差, 制约着食品中青霉素残留免疫检测法的发展。

本文从苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 中克隆并表达了一种与青霉素 G 具有高亲和力的新型的蛋白质 Bt-PBP2, 并证实该蛋白质能与青霉素 G 发生特异性结合, 利用 Bt-PBP2 作为抗原, 设计了竞争酶联法快速准确的测定牛奶中青霉素 G 的残留的方法。该方法具有操作简单, 灵敏度高等特点, 为进一步开发快速、高效青霉素残留检测试纸条设计奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苏云金芽胞杆菌 BMB171、大肠杆菌 *E.coli* DH5 α 、大肠杆菌表达宿主 *E.coli* BL21 (DE3)、表达质粒 pET28a(+) Invitrogen 公司; LB 培养基胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 氯化钠 10 g/L, pH7.0~7.4, 121 °C 灭菌 30 min; 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、蛋白质 Marker 等分子生物学试剂 北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司; 氯化钠、青霉素 G 等常规生化试剂 国药集团; DNA 片段回收试剂盒 Omega 公司; Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS 蛋白荧光标记试剂盒 德国 NanoTemper Technologies 公司。

Peltier Thermal Cycler(PTC-100TM)PCR 仪 美国 MJ Research 公司; 5415D 离心机 德国 Eppendorf 公司; 恒温培养箱 广州医疗器械厂; GAS-2000 凝胶成像系统 3Y 美国柯达公司; DYY-11 电泳仪 北京六一仪器厂; 恒温恒湿箱摇床 武汉瑞华仪器设备公司; MST, NT.115 微量热泳动仪 德国 NanoTemper 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 Bt 总 DNA 的提取 挑取单菌落接种液体 LB 培养基, 活化至对数生长中期; 1% 转接到 100 mL LB 液体培养基中, 30 °C, 250 r/min 培养至对数生长中期, 收集菌体, 按照萨姆布鲁克^[9]的方法提取苏云金芽胞杆菌 BMB171 总 DNA。

1.2.2 Bt 中青霉素 G 结合蛋白基因 *Bt-pbp2* 的克隆 参照萨姆布鲁克^[9]的方法, 以提取的 Bt BMB171 总 DNA 为模板, 采用 Pfu DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。50 μ L PCR 反应体系: 模板 DNA 基因组 1 μ L, 引物 P1 和 P2(10 μ mol/L)各 21 μ L, dNTP 2 μ L, Pfu DNA 聚合酶 1 μ L, 总反应体系 50 μ L。反应程序为 94 °C、5 min, 95 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、2 min, 30 个循环, 72 °C、10 min, 25 °C、1 s。

1.2.3 青霉素 G 结合蛋白基因 *Bt-pbp2* 的表达载体的构建 参照萨姆布鲁克^[9]的方法, 切胶回收的 *Bt-pbp2* 基因 PCR 产物, 与载体 pET-28a(+) 共同在 37 °C *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切 4 h, 琼脂糖电泳后分别切胶回收外源和载体, T4 连接酶将外源基因与 pET-28a(+) 于 16 °C 过夜连接, CaCl₂ 法转化导入 *E.coli* DH5 α , 涂布含有卡拉霉素 LB 平板。随机挑取转化子菌落 PCR 验证阳性克隆, 选取三个阳性克隆, 接种至含有卡拉霉素的液体 LB 培养基中抽取质粒, 酶切验证, 再测序验证没有发生点突变。提取重组载体 pET28a(+) - *pbp2* 转化表达宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3)。构建含有 pET28a(+) - *pbp2* 的表达宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 命名为 *E.coli* Bt-PBP2。

1.2.4 青霉素结合蛋白 Bt-PBP2 的诱导表达 参照萨姆布鲁克^[9]的方法, 将 *E.coli* Bt-PBP2 在平板上挑取单菌落, 接种含有卡拉霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜活化, 将菌液按 1/100 比例加入新鲜的卡拉霉素 LB 液体培养基, 37 °C, 200 r/min 培养至对数生长中期, 加入 IPTG 诱导 (IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L) 250 r/min, 16 °C 培养过夜后将培养瓶置于冰上 5 min; 4 °C, 12000 r/min 离心收集菌体, 预冷的 ddH₂O 重悬菌体沉淀, 再次离心收集菌体, 备用。

1.2.5 Bt-PBP2 蛋白的纯化 参照萨姆布鲁克^[9]的方法, 用 4 °C 的可溶结合缓冲液 (10 mmol/L 咪唑, NaCl 0.5 mol/L, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 重悬菌体, 置于冰上超声波破碎至悬液变澄清; 4 °C, 12000 r/min 离心 60 min, 收集上清液, 经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后缓缓加入到 Ni 琼脂糖凝胶柱中, 随后使用 15 倍柱体积的可溶结合缓冲液冲洗柱子, 洗脱杂蛋白; 然后用洗脱缓冲液 (500 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.9) 洗脱柱子, 收集洗脱液。随后 15 kDa 截流管去除咪唑, 无菌水重新溶解得到纯化蛋白质 Bt-PBP2。

1.2.6 微量热泳动仪 (MST) 测 Bt-PBP2 蛋白与青霉素 G 相互作用 参照 NanoTemper Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS 试剂盒操作步骤将纯化 Bt-PBP2 蛋白进行荧光标记。测定前, 将蛋白样品加入 0.1% 的吐温-20 以减小蛋白在毛细管内壁的附着, 用 PBS 稀释一定倍数将已经标记的 Bt-PBP2 蛋白样品荧光值调节至在 200~1500 范围之间; 随后将青霉素 G 溶于 PBS 缓冲溶液中配制成将小分子配体, 用 PBS 将小分子配体青霉素 G 进行梯度稀释成 16 个不同浓度梯度, 其中最高浓度为 128 μ g/L 依次两倍稀释至最低浓度 0.00375 μ g/L; 稀释后的蛋白样品和小分子配体化合物于 12000 r/min, 4 °C 离心

5 min, 随后分别取上清; 将蛋白样品上清与 16 个不同浓度的青霉素 G 按 1:1 混合, 填充 16 根毛细管, 进行微量热泳动分析。

1.2.7 利用 Bt-PBP2 蛋白测定牛奶中青霉素 G 残留

1.2.7.1 标准样品的制备 用 PBS 配制浓度梯度为 0、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0、64.0、128.0、256.0 $\mu\text{g/L}$ 的青霉素 G 标准溶液。用辣根过氧化物酶标记的青霉素 (HRP-Amp) 溶于 PBS 缓冲溶液, 终浓度为 2 g/L 。

1.2.7.2 制板 纯化的 Bt-PBP2 蛋白作为包被蛋白, 酶标板每孔中加入 Bt-PBP2 蛋白 100 μL (浓度 400 $\mu\text{g/L}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, PBST (PBS + 0.05% Tween-20) 洗一遍拍干, 加 2% BSA 封闭液 150 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h, PBS 洗涤三次, 拍干。

1.2.7.3 加样 各孔加入 100 μL 青霉素 G 标准溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 h, PBST 洗涤三次, 拍干。每孔中加入 50 μL HRP-Amp, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 倾去孔内液体, PBST 洗涤三次, 拍干。

1.2.7.4 测定吸光度值 A_{450} 加入 100 μL 新配制的四甲基联苯胺溶液 (TMB), 室温避光孵育 10 min, 立即向每孔中加入 50 μL 终止液 (2 mol/L), 蓝色变黄色, 迅速放入酶标仪中, 450 nm 波长测定吸光度值 A_{450} 。

1.2.7.5 添加回收率 在不含有青霉素 G 的脱脂牛奶中添加一定量的青霉素 G, Amp 的终浓度为 5、10、20、40 ng/mL , 按以上方法检测, 酶标板微孔中 450 nm 处的吸光度 A_{450} , 每个样品做 6 个平行样 ($n=6$)。

1.3 数据处理

实验至少重复三次以上, 所得数据用 SPSS 进行方差分析, 采用 OriginPro 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 Bt-pbp2 基因的克隆

根据已报道的金黄色葡萄球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) R6 菌株青霉素结合蛋白 PBP2 公布的蛋白质序列 (GI: 15902348), 通过 tBLAST 比对苏云金芽胞杆菌 BMB171 中的基因组^[10], 发现一个覆盖度仅为 94%, 相似度为 31% 的新型蛋白质, 命名为 Bt-PBP2, 其基因命名为 *Bt-pbp2*。按照 1.2.1 方法提取苏云金芽胞杆菌 BMB171 的总 DNA, 上游引物 P1: CCGCATATGATGAAGTGGACAAAAAG, 下游引物 P2: CCGCTCGAGTTAGTCTCCTAAAGTTAA, 扩增 *Bt-pbp2* 基因, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 大小约 2.1 kb, 与预期大小一致 (图 1), 切胶回收 PCR 扩增片段, 测序, 结果表明所获得片段的核苷酸序列与 Bt BMB171 中一致, 证明成功克隆到 *Bt-pbp2* 基因。

2.2 表达载体 pET28a (+)-pbp2 的构建

回收的 PCR 产物与载体 pET28a (+) 分别用 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切, T4 连接酶连接成 pET28a (+)-*pbp2* 重组载体 (图 2), 菌落 PCR 验证, 随机选取三个克隆子提取质粒经 *EcoRV*, *XhoI* 酶切验证为 3.9 kb, 3.4 kb 符合预期 (图 3)。测序结果表明 *pbp2* 基因序列与预期序列完全一致, pET28a (+)-*pbp2* 重组载体构建成功。提取重组载体 pET28a (+)-*pbp2* 转化

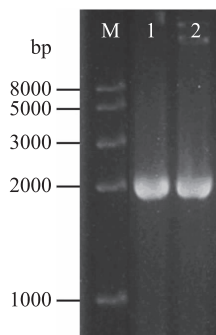


图 1 PCR 扩增 *Bt-pbp2* 基因的凝胶电泳图

Fig.1 The gel electrophoresis of gene *Bt-pbp2* amplification products

注: M 是 DNAMaker, 1、2 PCR 扩增得到的 *Bt-pbp2* 基因。表达宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3)。构建的含有 pET28a (+)-*pbp2* 的表达宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3) 命名为 *E.coli* Bt-PBP2。

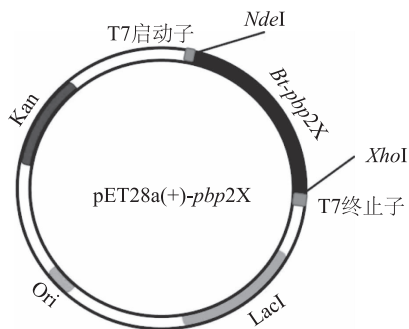


图 2 重组质粒 pET28a (+)-*pbp2* 图谱。

Fig.2 The recombinant plasmid pET28a (+)-*pbp2*

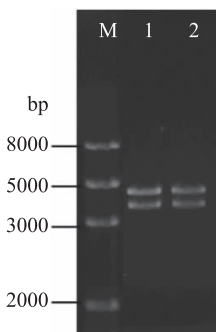


图 3 pET28a (+)-*pbp2* 用 *EcoRV*, *XhoI* 酶切片段

Fig.3 The cleaved fragments of pET28a (+)-*pbp2* using *EcoRV*, *XhoI* restriction enzyme
注: M 是 DNA 分子量标准; 1、2 是 pET28a (+)-*pbp2* 用 *EcoRV*, *XhoI* 酶切片段。

2.3 Bt-PBP2 蛋白的诱导表达及纯化

按照 1.2.4 方法通过 IPTG 诱导表达蛋白质, 按照 1.2.5 方法提取蛋白质 Bt-PBP2, SDS-PAGE 鉴定为单一条带无明显杂蛋白, 蛋白质分子量约为 78 kDa, 大小符合预期 (图 4)。

2.4 Bt-PBP2 蛋白质具有特异性结合青霉素 G 的活性

用 15 kDa 截流管去除咪唑, 用 PBS 缓冲液重新溶解 Bt-PBP2 蛋白质, 依照方法 1.2.6 将 Bt-PBP2 蛋

表1 添加回收率
Table 1 The recovery rate

| 添加浓度 (ng/mL) | 实际测定浓度 (ng/mL) | | | | | | 添加回收率 (%) |
|--------------|----------------|-----|------|------|------|------|-------------|
| 5 | 4.8 | 4.8 | 4.9 | 4.2 | 4.7 | 5.02 | 94.4 ± 6.32 |
| 10 | 9.7 | 10 | 8.9 | 8.9 | 9.1 | 10 | 93.8 ± 5.72 |
| 20 | 18.6 | 20 | 17.8 | 17.9 | 19.6 | 18.1 | 93.4 ± 5.24 |

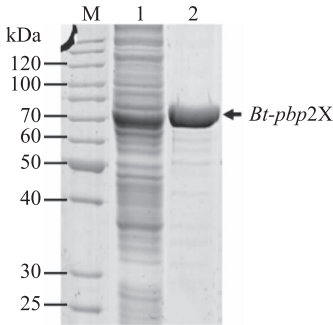


图4 SDS-PAGE 检测大肠杆菌中分离提取的 Bt-PBP2 蛋白质

Fig.4 The SDS-PAGE of Bt-PBP2 protein extracted from *E.coli*

注: M 是蛋白分子量标准; 1 是诱导上清; 2 是纯化蛋白。

白标记荧光, 通过调整稀释浓度, 调节 Bt-PBP2 蛋白质荧光值在 200 ~ 1500 范围之间。用 Prometheus NT.48 测定两者相互作用后微泳动变化情况, 以荧光强度变化值为纵坐标, 青霉素 G 的浓度为横坐标, 进行拟合曲线(图 5), 经测定 Bt-PBP2 蛋白与青霉素 G 亲和常数 Kd 为 10.36 nmol/L。该结果证明大肠杆菌表达纯化的 Bt-PBP2 确实与青霉素 G 存在着特异性相互作用, 该蛋白质具有具有特异性结合青霉素 G 的活性。

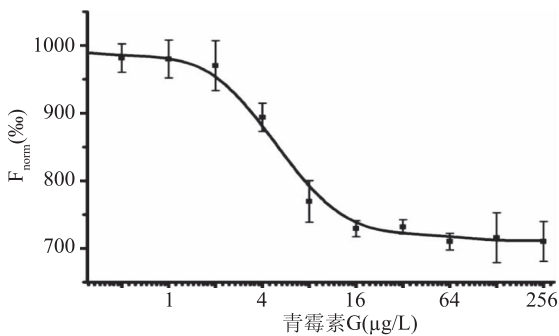


图5 带荧光标记 Bt-PBP2 蛋白质与不同浓度青霉素 G 结合后热泳动变化

Fig.5 The thermophoretic movement of fluorescent Bt-PBP2 proteins changes upon binding to different concentrations of penicillin G

2.5 Bt-PBP2 蛋白质用于测定牛奶中青霉素 G 残留

按照方法 1.2.7, 以标准样品浓度为横坐标, 标准样品的 A₄₅₀ 吸光度值为纵坐标, 用 SPSS 软件, 绘制 Bt-PBP2 蛋白竞争性结合青霉素 G 标准曲线。当青霉素 G 浓度在 4~256 µg/L 的时候, 吸光度与青霉素 G 浓度有线性关系 $A_{450} = -0.1278 \ln(C_{Am}) + 1.1067$,

$R^2 = 0.9757$ 。在不含有青霉素 G 的脱脂牛奶中添加一定量的青霉素 G, 添加终浓度分别为 5、10、20 ng/mL, 然后用以上方法平行检测样品中青霉素 G 的含量, 每个样品做 6 个平行样 (n = 6)。测定结果表明, 当牛奶中添加浓度分别是 5、10、20 ng/mL 时, 其添加回收率分别平均达到 94.4% ± 6.32%、93.8% ± 5.72%、93.4% ± 5.24%; 在添加浓度为 0 ng/mL 中, 没有出现假阳性, 也没有假阴性(表 1)。以上结果表明 Bt-PBP2 蛋白质可用于定量测定牛奶中青霉素 G 的残留。

3 结论

青霉素结合蛋白(PBPs)因为最初发现能和青霉素共价结合而得名, PBPs 的生物学功能现在研究比较清楚的是革兰氏阴性细菌大肠杆菌 (*E. coli*) 的 PBPs, 大肠杆菌含有 8 种 PBPs 分别是 PBP1~PBP8, 其中 PBP1、PBP2、PBP3 主要负责维持细胞的形态, 维持大肠杆菌的张力, 与细菌分裂有关, PBP4 具有 D, D-羧肽酶和 D, D-内肽酶活性, PBP5、PBP6 的羧基末端可稳定蛋白质, 稳定肽聚糖结构; PBP7、PBP8 具有 D, D-内肽酶的活性^[3]。此外, 在革兰氏阳性细菌中, 肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 耐药菌株和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 耐甲氧西林型菌株的 PBPs 研究比较多, 其研究重点在于这些耐药菌株的 PBPs 如何丧失了与 β-内酰胺类抗生素共价结合的能力^[11-14], 早在 1996 年肺炎链球菌中 PBP2x 的蛋白质结构已经解析出来^[15], 随后研究发现肺炎链球菌共有 6 种 PBPs, 分别为 PBP1a、PBP1b、PBP2a、PBP2x、PBP2b 和 PBP3, 其中 PBP1a、PBP2a、PBP2x 和 PBP2b 是 β-内酰胺类抗生素作用的作用靶点, 在肺炎链球菌耐药菌株中与青霉素的亲和力较低^[11-12]。金黄色葡萄球菌存在 5 种 PBPs, 它们分别是 PBP1、PBP2、PBP3、PBP4 及 PBP2b^[3, 16-17], 2002 年耐甲氧西林型金黄色葡萄球菌的 PBP2a 晶体结构已经被解析出来^[18]。国外利用来自肺炎链球菌的 PBP2x 作为受体蛋白, 成功研发出快速检测青霉素类抗生素残留的试剂盒, 比如 Randox 公司^[3-4, 19]。2008 年, 李铁柱等^[20]利用大肠杆菌表达了出了青霉素结合蛋白 PBP2x 并证实了可以用于牛乳青霉素残留检测中的应用, 但尚未有商品化的试剂盒推出。

本文克隆并表达了一种新型青霉素结合蛋白 Bt-PBP2, 并证实其与青霉素 G 有特异性相互作用, 与肺炎链球菌的 PBP2x 相比其覆盖度仅为 94%, 相似度为 31%, 其与青霉素 G 的 Kd 值比肺炎链球菌的 PBP2x 略小, 利用该蛋白质与青霉素 G 特异性结合的 (下转第 140 页)

大学,2009.

[8] 宋超洋. 小米速溶粉的制备及其性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.

[9] 崔春利, 杨范莉, 曾凯竹, 等. 山菜萸速溶粉的喷雾干燥工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(2): 180-183.

[10] 张妍, 高蕾, 王正红, 等. 响应面实验优化喷雾干燥制备核桃分心木速溶粉及其冲调性分析[J]. 食品科学, 2016, 37(18): 47-51.

[11] Shishir M R I, W Chen. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices[J]. Trends in Food Science & Technology, 2017(65): 49-67.

[12] 熊曼萍, 姜琼. 利用热风喷雾干燥方法生产纯天然柑橘(橙)果粉[J]. 食品与机械, 2007, 23(1): 123-124.

[13] 王泽南, 范方宇, 王华, 等. 草莓粉喷雾干燥工艺参数及助剂配料的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 28(9): 117-119.

[14] 程丽娜, 唐道邦, 徐玉娟, 等. 荔枝原浆喷雾干燥配方优化研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(3): 71-74.

[15] S N Bhusari, K Muzaffar P Kumar. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind

pulp powder[J]. Powder Technology, 2014(266): 354-364.

[16] Ahmed M, Akter M S, Eun J B. Impact of alpha-amylase and maltodextrin on physicochemical, functional and antioxidant capacity of spray-dried purple sweet potato flour[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(3): 494.

[17] Liu J, Zhang M, Wang S. Processing characteristics and flavour of full lotus root powder beverage[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2010, 90(14): 2482-2489.

[18] 肖贵平. 莲心菊花保健饮料的研制[N]. 农学学报, 2012, 2(3): 44-49.

[19] 周爱梅, 万艳娟, 李少华, 等. 喷雾干燥及热风干燥对南瓜粉营养特性和感官品质的影响[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 528-533.

[20] 中国饮料工业协会标准法规部. GB7101-2015 食品安全国家标准 饮料标准解读[J]. 饮料工业, 2016, 19(1): 8-9.

[21] 任彬, 李锐, 张伍金. 速溶紫薯粉加工的助干剂与喷雾干燥工艺优化[J]. 食品科技, 2015, 41(6): 212-216.

[22] 陈启聪, 黄惠华, 王娟, 等. 香蕉粉喷雾干燥工艺优化[N]. 农业工程学报, 2010, 26(8): 331-337.

(上接第 129 页)

能力, 开发设计了牛奶中青霉素 G 残留的检测方法; 回收率达到 93.4% 以上, 在添加浓度为 0 ng/mL 中, 没有出现假阳性, 也没有假阴性, 以上结果表明 Bt-PBP2 蛋白质可用于定量测定牛奶中青霉素 G 的残留。该方法样品前处理过程简单方便, 不需要仪器设备, 方便用于牛奶收储站进行现场的快速检测, 为进一步开发快速、高效的青霉素残留检测试纸条设计奠定了基础。

参考文献

[1] 潘贤仪, 潘若静. 临床实用抗生素药理学[M]. 合肥: 合肥工业大学出版社, 2011.

[2] 李冀, 杨慧, 呼延霆, 等. 细菌青霉素结合蛋白[J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 418-426.

[3] 苏思婷, 毛丹丹, 许师文, 等. 青霉素结合蛋白及其介导细菌耐药的研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 902-910.

[4] Sauvage E, Kerff F, Terrak M, et al. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis[J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32(2): 234-258.

[5] 谢会玲. 牛奶中头孢类抗生素的免疫层析试纸条和 ELISA 试剂盒检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.

[6] 孙法良. 氟苯尼考、安普霉素药物残留的 ELISA 检测方法研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.

[7] 韩庆功, 崔艳红. ELISA 检测技术在畜产品抗生素类药物残留检测中的应用[J]. 生物技术通报, 2008, 12(4): 89-93.

[8] 张静. 基于青霉素结合蛋白 PBP3 的 β -内酰胺类药物残留检测及蛋白结构的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[9] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2007.

[10] Jin H, Xiao-hu S, Hua-jun Z, et al. Complete genome sequence of Bacillus thuringiensis mutant strain BMB171[J]. J Bacteriol, 2010, 192(15): 4074-5.

[11] Zhou X, Liu J, Zhang Z, et al. Molecular characteristics of

penicillin-binding protein 2b, 2x and 1a sequences in Streptococcus pneumoniae isolates causing invasive diseases among children in Northeast China[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(4): 633-45.

[12] Yuan L, Benjamin J M, Sopio C, et al. Penicillin-Binding Protein Transpeptidase Signatures for Tracking and Predicting beta-Lactam Resistance Levels in Streptococcus pneumoniae[J]. MBio, 2016, 7(3): e00756-16.

[13] Cristian JA, Ayala SC, Paulino G. In vivo functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of Pseudomonas aeruginosa[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 234.

[14] 周宇, 王长振, 侯粲, 等. 肺炎链球菌中青霉素结合蛋白 PBP3 在大肠杆菌中的可溶性表达及活性鉴定[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 327-333.

[15] Pares S, Mouz N, Pétillot Y, et al. X-ray structure of Streptococcus pneumoniae PBP2x, a primary penicillin target enzyme[J]. Nat Struct Biol, 1996, 3(3): 284-293.

[16] Jaehae J, Yiseul K, Catleya R, et al. Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from Listeria monocytogenes[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(8): 3507-3519.

[17] Daniel S, Gro AS, Kari HB, et al. Identification of pneumococcal proteins that are functionally linked to penicillin-binding protein 2b (PBP2b)[J]. Mol Microbiol, 2017, 103(1): 99-116.

[18] Daniel L, Natalie C J S. Strynadka. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(11): 870-876.

[19] 库婷, 刘永峰, 张玲玲, 等. 牛乳品质检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 375-380, 385.

[20] 李钰柱. 青霉素结合蛋白克隆表达及在牛乳青霉素残留检测中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2008.