

油料蛋白

DOI: 10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.210145

# 大肠杆菌细胞膜固定相萃取辣木籽抗菌肽

和 丽<sup>1,2</sup>,许映月<sup>1</sup>,陈凤敏<sup>1</sup>,黄艾祥<sup>1</sup>,王雪峰<sup>1,2</sup>

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院,昆明 650201; 2. 云南省畜产品加工工程技术研究中心,昆明 650201)

**摘要:**制备大肠杆菌细胞膜固定相(*E. coli* cell membrane stationary phase, ECMSP),研究其对辣木籽抗菌肽的萃取效果。研究超声时间、超声功率对大肠杆菌破壁效果的影响,分析大肠杆菌细胞膜与大孔硅胶的吸附特征及 ECMSP 对辣木籽抗菌肽的吸附效果,明确萃取前后抑菌活力变化及反相-高效液相色谱(RP-HPLC)差异峰。结果表明:在超声功率 500 W、超声时间 30 min 条件下,大肠杆菌破壁效果较好;大孔硅胶对大肠杆菌细胞膜的饱和吸附值( $C_s^{\max}$ )为 9.98  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 、吸附常数( $K^*$ )为 171.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;萃取前后抗菌肽对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制效果差异明显,RP-HPLC 分析表明萃取前后出现了 3 个差异峰。研究结果可为辣木籽抗菌肽的后续开发利用提供理论基础和应用参考。

**关键词:**大肠杆菌;大肠杆菌细胞膜固定相;辣木籽抗菌肽;萃取;抑菌率

中图分类号:TQ936;R978.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)02-0065-06

## Extraction of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides by *E. coli* cell membrane stationary phase

HE Li<sup>1</sup>, XU Yingyue<sup>1</sup>, CHEN Fengmin<sup>1</sup>, HUANG Aixiang<sup>1</sup>, WANG Xuefeng<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Engineering Technology Research Center for Processing of Livestock Products, Kunming 650201, China)

**Abstract:** *E. coli* cell membrane stationary phase (ECMSP) was prepared, and its extraction effect of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides was studied. The effects of ultrasonic time and ultrasonic power on the wall breaking effect of *E. coli* were studied. The adsorption characteristics of *E. coli* cell membrane and macroporous silica gel, and the adsorption effect of ECMSP on the *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides were analyzed. The change of antibacterial activity and the reverse-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) difference peaks before and after extraction were clarified. The results showed that when the ultrasonic power was 500 W and the ultrasonic time was 30 min, the wall breaking effect was good. The saturated adsorption value ( $C_s^{\max}$ ) of the macroporous silica gel to the cell membrane of *E. coli* was 9.98  $\mu\text{g}/\text{mg}$ , and the adsorption constant ( $K^*$ ) was 171.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The inhibitory effects of antimicrobial peptides on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were significantly different, and RP-HPLC analysis showed three different peaks before and after extraction. The research could provide theoretical basis and application references for the subsequent

development and utilization of *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptides.

**Key words:** *Escherichia coli*; *E. coli* cell membrane stationary phase; *Moringa oleifera* seed antimicrobial peptide; extraction; antibacterial rate

收稿日期:2021-03-08;修回日期:2021-09-27

基金项目:国家自然科学基金地区项目(31960462);云南省基础研究计划面上项目(2019FB052);云南省农业联合专项(2018FG001-040);云南省教育厅科学研究基金项目(2019J0114)

作者简介:和 丽(1995),女,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全(E-mail)18288842687@qq.com。

通信作者:黄艾祥,教授(E-mail) aixianghuang@126.com;王雪峰,副教授(E-mail)364135728@qq.com。

抗菌肽(Antimicrobial peptides, AMPs),又称肽类抗生素(peptide antibiotics),是一类具有广谱抗菌

活性的小分子肽,一般含 5~100 个氨基酸<sup>[1-2]</sup>。抗菌肽的作用机制不同于抗生素,不产生耐药性,能够替代传统抗生素,是近年来国内外的研究热点<sup>[3-5]</sup>。目前,对抗菌肽筛选、分离的方法有超滤法<sup>[6]</sup>、凝胶色谱层析法<sup>[7-8]</sup>、高效液相色谱法<sup>[9]</sup>等。抗菌肽的筛选、分离较为复杂,往往需要几种方法结合使用。贺浪冲等<sup>[10]</sup>首次报道了细胞膜色谱法,该方法是将具有活性的细胞膜固定在硅胶载体表面,形成载体细胞,将液相色谱、细胞生物学与受体药理学相结合形成一种能模仿药物与靶体相互作用的色谱系统<sup>[11]</sup>。细胞膜色谱法借助大孔硅胶的刚性作用和细菌的细胞膜,更加真实地模拟了细胞膜结构。Hou<sup>[12]</sup>、Wang<sup>[13]</sup>等将细胞膜色谱法进行推广并成功运用到中药资源活性物质的筛选,带动了该技术的发展。肖建辉<sup>[14]</sup>利用细胞膜色谱技术从麻疯树籽粕中有效分离出 JCpep7 和 JCpep8;唐亚丽<sup>[15]</sup>同样利用此技术从家蝇中分离筛选出了 MDpep5 和 MDpep9。因此,细胞膜色谱法有望成为一种快速、有效的抗菌肽筛选方法。

辣木(*Moringa oleifera*)为云南特色植物资源,辣木籽富含多种营养物质,具有营养保健作用,但目前对于辣木籽抗菌肽的研究报道较少。本文对大肠杆菌进行超声破壁,利用大肠杆菌细胞膜与大孔硅胶进行吸附制备细胞膜固定相,采用大肠杆菌细胞膜固定相联合反相-高效液相色谱(RP-HPLC)筛选辣木籽抗菌肽,研究萃取前后抑菌活性变化并明确 RP-HPLC 差异峰,为后续抗菌肽的靶向筛选提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

辣木籽,云南天佑科技开发有限公司;氯化钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,均为分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司;牛血清白蛋白、乙腈、甲醇,均为色谱纯,德国默克股份两合公司;三羟甲基氨基甲烷、LB 肉汤培养基, Sigma 公司;考马斯亮蓝 G-250,上海康朗生物科技有限公司;大孔硅胶,分析级,苏州赛分科技股份有限公司;大肠杆菌 CICC10003、金黄色葡萄球菌 CICC10384,中国工业菌种保藏中心。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,安捷伦公司;UV-1800CP 型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;SCQ-92018 数控加热超声波清洗机,上海声彦超声波仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴

锅,国华电器有限公司;CP153 电子天平,奥豪斯仪器有限公司;DT5-2 离心机,上海安亭科学仪器厂;HI99161pH 计,意大利哈纳仪器有限公司;Eclipse E200 型显微镜,上海奋业光电仪器设备有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 辣木籽蛋白的提取

参考王雪峰等<sup>[16]</sup>的方法,稍作修改。辣木籽脱脂粕→0.3 mol/L 的 NaCl 溶液溶解(料液比 1:10)→用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.15→电动搅拌仪搅拌 30 min→抽滤,去除残渣,收集滤液→50℃浓缩至总体积的 1/3→真空冷冻干燥→辣木籽蛋白粉→-20℃保存备用。

#### 1.2.2 辣木籽多肽的制备

参考王雪峰等<sup>[16]</sup>的方法,稍作修改。辣木籽蛋白粉→纯水溶解混匀(料液比 1:30)→加入 5.5% 碱性蛋白酶于 55℃ 水浴酶解 4.5 h→沸水浴灭酶 10 min→离心(5 000 r/min, 15 min)→收集上清液→超滤截留(3 kDa)→收集滤液透析 6~12 h(透析袋分子质量 100~500 Da)→真空冷冻干燥→辣木籽多肽→-20℃保存备用。

#### 1.2.3 大肠杆菌细胞膜(*E. coli* cell membrane, ECM)的制备

参考杨文博<sup>[17]</sup>的方法并进行适当调整。取大肠杆菌活化至对数期后用生理盐水离心洗涤 3 次。取沉淀悬浮于 50 mmol/L, pH 7.2 的 Tris-HCl 溶液中,取菌体悬浮液于反应管中,于 4℃ 以一定超声功率超声破碎一定时间(每次超声时间 9 s, 间隔时间 6 s),在显微镜下观察其形态,破碎到一定程度后离心(3 000 r/min, 10 min),取上清液,并于 4℃ 下离心(10 000 r/min, 20 min),取沉淀加入 1 mg DNA 酶后用 Tris-HCl 重悬,37℃ 培养 1 h 后以 4 500 r/min 离心 10 min,收集上层液体,将上层液体以 10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀用 Tris-HCl 缓冲溶液洗涤 3 次,即得大肠杆菌细胞膜。

参照康洁<sup>[18]</sup>的方法并做适当调整,采用显微镜检测法和番红溶液染色法对细胞形态进行观察。吸取少量破壁后的菌液用番红溶液染色,1 min 后用清水清洗,用酒精灯烘干,通过显微镜观察比较细胞内容物的渗出情况,确定其破壁效果。

#### 1.2.4 大肠杆菌细胞膜固定相(ECMSP)的制备

参照李连连<sup>[19]</sup>的方法并进行调整对大孔硅胶载体进行活化。取 1 g 大孔硅胶加到 200 mL 1 mol/L 的 HCl 溶液中,50 Hz 条件下超声 15 min,

搅拌回流 2 h 后,重复洗涤至上清液 pH 中性,滤纸过滤,将大孔硅胶于 120 ℃ 下活化 7 h,大孔硅胶需要制备现用。

参考肖建辉<sup>[14]</sup>的方法并进行适当调整制备 ECMSP。取等量活化后的大孔硅胶与 150 μg/mL ECM 悬液混匀→4 ℃ 下振荡吸附 12 h→50 Hz 条件下超声研磨 20 min→加入适量去离子水离心(4 000 r/min, 20 min)→取沉淀洗涤获得 ECMSP。

### 1.2.5 ECMSP 性质分析

#### 1.2.5.1 ECM 吸附等温线的绘制

参考 Bilgili<sup>[20]</sup>的方法并进行适当修改绘制 ECM 吸附等温线。取等量活化后的大孔硅胶和不同质量浓度的 ECM 悬液混匀,在 4 ℃、150 r/min 条件下振摇 12 h,再加入等体积的纯水,于 50 Hz 超声 20 min 并离心。采用考马斯亮蓝法测定初始 ECM 悬液中蛋白质的质量浓度和上清液中 ECM 蛋白质的质量浓度,并计算单位质量的大孔硅胶吸附的 ECM 的蛋白质质量。以单位质量的大孔硅胶吸附的 ECM 的蛋白质质量为纵坐标,初始 ECM 悬液中的蛋白质质量浓度为横坐标,绘制吸附等温线。根据实验结果,对上述方程进行线性回归,按 Langmuir 吸附等温线方程  $1/C_s = (1 + K^* C_m)/(C_s^{max} K^* C_m) = 1/(C_s^{max} K^* C_m) + 1/C_s^{max}$  ( $C_s$  为单位质量大孔硅胶吸附的 ECM 的蛋白质质量, μg/mg;  $C_m$  为初始 ECM 悬液中蛋白质质量浓度, μg/mL;  $C_s^{max}$  为单位质量大孔硅胶吸附的 ECM 的最大蛋白质质量, μg/mg;  $K^*$  为吸附常数, μg/mL), 计算得到大孔硅胶表面 ECM 的饱和吸附值和吸附常数。

#### 1.2.5.2 蛋白质含量的测定<sup>[16]</sup>

采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。蛋白质标准溶液:称取 11.3 mg 牛血清白蛋白,用 0.9% 的 NaCl 定容至 1 mL,制成 11.3 mg/mL 的标准储备溶液,再逐级稀释,得到系列质量浓度的蛋白质标准溶液。考马斯亮蓝 G-250(0.01%) 染液:称取 0.1 g 考马斯亮蓝 G-250,溶于 50 mL 90% 乙醇中,加入 100 mL 0.85 g/mL 的磷酸后用蒸馏水定容至 1 000 mL。标准曲线的绘制:取 7 支 10 mL 具塞试管,分别进行 1~7 编号后,依次加入 1 mL 不同质量浓度的蛋白质标准溶液和 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液,盖塞后混匀,于 595 nm 波长处测定吸光值,以 0.9% 的 NaCl 代替蛋白质标准溶液作空白对照,以蛋白质标准溶液质量浓度为横坐标,595 nm 波长处吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得到标准曲线方程

为  $y = 0.0647x + 0.0349$  ( $R^2 = 0.9996$ )。

取 1 mL ECM 悬液或滤液于 10 mL 试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液,混匀,室温静置 5 min 后测定其在 595 nm 处的吸光值,空白组用蒸馏水代替 ECM 悬液或滤液,再根据标准曲线方程得到初始 ECM 悬液及滤液 ECM 上的蛋白质含量。

#### 1.2.5.3 ECMSP 的表面特征观察

取适量固定相或载体硅胶于载玻片上,用番红染色,1 min 后用清水清洗,用酒精灯烘干后在显微镜下观察其表面特征。

#### 1.2.6 ECMSP 对辣木籽抗菌肽的萃取

以 ECMSP 作为细胞膜色谱法的固定相。配制质量浓度 0.5 mg/mL 的辣木籽多肽,将等量的辣木籽多肽和 ECMSP 加到反应管中,于 37 ℃ 下振荡反应 1 h 后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,收集滤液,并将滤出物用 PBS 缓冲液(50 mmol/L, pH 7.2)洗涤 3 次,合并所有滤液,对抗菌肽萃取前后 RP-HPLC 差异峰及其抑菌活力变化进行分析。

#### 1.2.7 辣木籽抗菌肽的抑菌率测定

参考唐文婷<sup>[21]</sup>的方法测定抑菌率。将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌培养至对数期,离心收集菌体沉淀,用 PBS 洗涤 3 次后重悬至  $10^5$  CFU/mL。取 50 μL 经倍比稀释后的抗菌肽母液、100 μL 待测菌液和 100 μL 灭菌后的 LB 肉汤培养基混匀,在 37 ℃ 培养 12 h,用酶标仪在 600 nm 下测定吸光值,以 PBS 缓冲液作为对照组。抑菌率(Y)按式(1)计算。

$$Y = (A_0 - A)/A_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中:A 为样品的吸光值,  $A_0$  为对照的吸光值。

#### 1.2.8 辣木籽抗菌肽 RP-HPLC 测定

RP-HPLC 条件:Amethyst C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);进样量 10 μL;柱温 45 ℃;流速 0.5 mL/min;检测波长 215 nm;流动相 A 相为体积分数 0.1% 的三氟乙酸乙腈溶液, B 相为体积分数 0.1% 的三氟乙酸水溶液;梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 流动相的梯度洗脱条件

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.01	10	90
15.00	50	50
20.00	10	90

#### 1.2.9 数据分析

所有实验均进行 3 次,采用 Excel 2010、IBM SPSS Statistics 25 对数据进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 超声破壁参数的选择

#### 2.1.1 超声功率对大肠杆菌破壁效果的影响

按 1.2.3 方法,将一定量的菌体悬浮液置于反应管中,设定每次超声时间 9 s、间隔时间 6 s,固定超声时间为 25 min,考察超声功率(0、200、300、400、500、600 W)对大肠杆菌破壁效果的影响,结果见图 1。

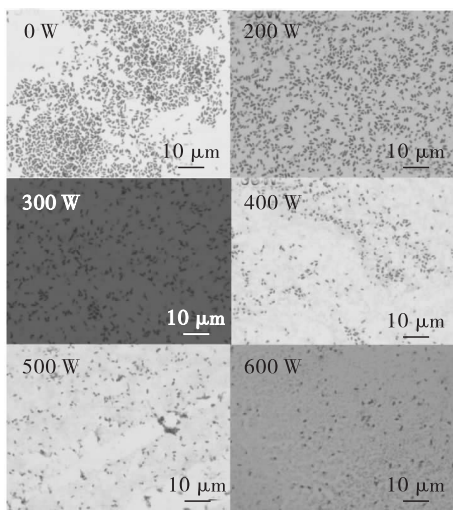


图 1 超声功率对大肠杆菌破壁效果的影响

由图 1 可知,随着超声功率的增加,菌体的破壁效果提高。当超声功率增加到 400 W 时,细胞开始有明显断裂的现象,局部出现了一些细胞碎絮;当超声功率为 500 W 时,破壁效果明显,菌体整体出现破碎现象;当超声功率增加至 600 W 时,大肠杆菌细胞出现絮状现象,原因可能是产生超声热效应,细胞发生炭化沉底,影响了破壁效果<sup>[22]</sup>。因此,最佳超声功率为 500 W。

#### 2.1.2 超声时间对大肠杆菌破壁效果的影响

按 1.2.3 方法,将一定量的菌体悬浮液置于反应管中,设定每次超声时间 9 s、间隔时间 6 s,固定超声功率 500 W,考察超声时间(0、15、20、25、30、35、40、45 min)对大肠杆菌破壁效果的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,随着超声时间的延长,菌体的破壁效果提高。当超声时间为 30 min 时,大肠杆菌细胞的破壁率明显提高,这主要是因为随着超声时间的延长,超声稳流振荡及空化效应积累增多,有利于细胞的破碎。然而,能量的增多会引起超声波的化学效应,即能量会将溶出的大分子打断或使其变性<sup>[22]</sup>,超声时间为 35~45 min 时,极可能出现超声波的化学效应。因此,选取最佳超声时间为 30 min。

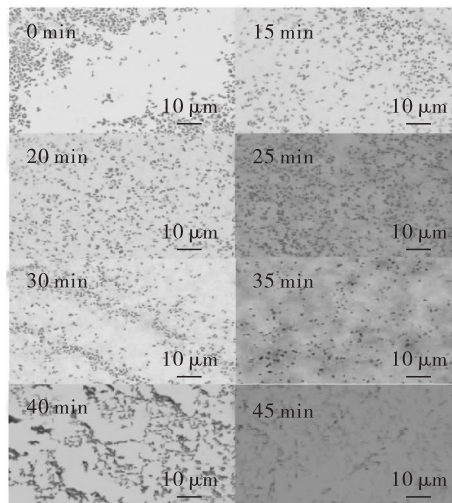


图 2 超声时间对大肠杆菌破壁效果的影响

### 2.2 ECMSP 性质分析

#### 2.2.1 ECM 吸附等温线

ECM 为悬液状态,不能直接作为固定相,需要将其固定在一定的载体上。研究表明,硅胶表面硅羟基(Si—OH)的吸附作用很强,硅胶自身具备一定的刚性,因而可以利用硅胶与大肠杆菌细胞膜形成载体细胞膜,作为色谱固定相<sup>[23]</sup>。裸露的大孔硅胶对 ECM 的吸附等温线如图 3 所示。

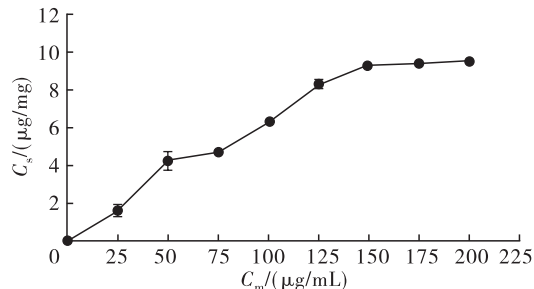


图 3 ECM 吸附等温线

由图 3 可知,当初始 ECM 悬液中蛋白质质量浓度( $C_m$ )大于 150  $\mu\text{g/mL}$  时,其吸附量随着  $C_m$  的进一步增加变化平缓,说明吸附趋于饱和。即当初始 ECM 悬液中蛋白质质量浓度大于 150  $\mu\text{g/mL}$  时,ECM 完全覆盖整个大孔硅胶表面。根据 Langmuir 吸附等温线方程求出吸附在大孔硅胶表面 ECM 的最大蛋白质质量浓度( $C_s^{\text{max}}$ )为 9.98  $\mu\text{g/mg}$ ,吸附常数( $K^*$ )为 171.02  $\mu\text{g/mL}$ 。

#### 2.2.2 ECMSP 的表面特征

将载体与 ECMSP 经过番红染色,镜检观察,结果见图 4。

从图 4 可以看出,裸露的大孔硅胶表面光滑,而 ECMSP 表面是粗糙的,说明 ECM 已经完全覆盖在硅胶表面。研究表明,在水溶液中硅胶表面硅氧桥(Si—O—Si)和硅羟基(Si—OH)等活性基团能强烈

并不可逆地吸附在细胞膜上的蛋白质和脂类等大分子物质上<sup>[24]</sup>,表明 ECM 能被牢固地吸附固定在大孔硅胶表面。除此之外,由于大肠杆菌细胞膜具有磷脂双分子层结构,脂质分子极性头间的离子相互作用以及膜内部烷基链间的疏水相互作用,能使吸附在硅胶表面的细胞膜碎片之间彼此靠近而融合并自动形成闭合结构,完全覆盖在硅胶表面<sup>[23]</sup>。

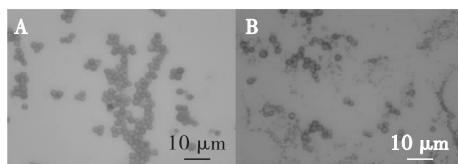


图4 载体硅胶(A)和 ECMSP(B)显微镜图

### 2.3 ECMSP 对辣木籽抗菌肽的萃取效果

ECMSP 对辣木籽抗菌肽的萃取效果见图 5。

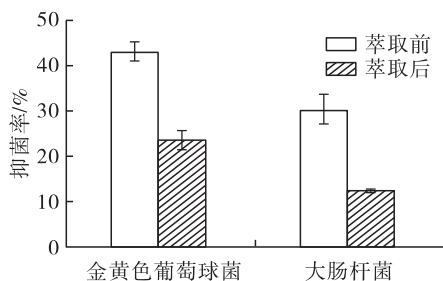


图5 ECMSP 萃取前后抗菌肽的抑菌活力变化

由图 5 可知,ECMSP 对辣木籽抗菌肽萃取前后的抑菌活力发生显著变化,萃取前辣木籽抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 43.13% 和 30.35%,萃取后的抑菌率分别为 23.73% 和 12.50%,说明 ECMSP 对辣木籽蛋白肽中具有抑菌活性的抗菌肽产生有效吸附,造成萃取前后的抑菌活力出现差异。

### 2.4 ECMSP 萃取前后辣木籽抗菌肽的 RP-HPLC 分析

采用 ECMSP 萃取辣木籽抗菌肽,对萃取前后的抗菌肽进行 RP-HPLC 分析,结果如图 6 所示。

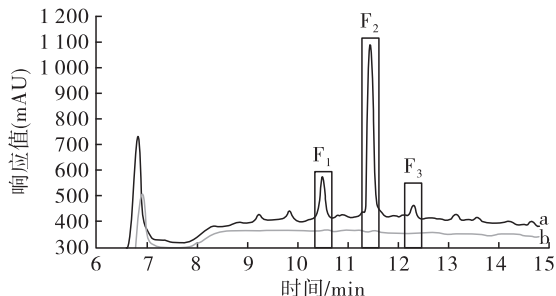


图6 ECMSP 萃取前(a)后(b)抗菌肽的 RP-HPLC 图谱

由图 6 可知,萃取前后辣木籽抗菌肽的色谱峰发生了明显变化,其中 F1、F2、F3 均消失,说明 3 个差异峰被 ECMSP 有效吸附,对比 ECMSP 对辣木籽

抗菌肽萃取前后的抑菌活力变化情况,表明这 3 个差异峰中有潜在抗菌肽,有待进一步的分离鉴定。

### 3 结论

对大肠杆菌进行超声破壁以制备 ECM,在超声功率 500 W、超声时间 30 min 条件下,破壁效果较好。大孔硅胶对 ECM 的饱和吸附值( $C_s^{max}$ )为 9.98  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,吸附常数( $K^*$ )为 171.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。ECMSP 对辣木籽抗菌肽的吸附效果明显,ECMSP 萃取前抗菌肽对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 43.13% 和 30.35%,ECMSP 萃取后的抑菌率分别为 23.73% 和 12.50%。RP-HPLC 分析表明,辣木籽抗菌肽经 ECMSP 萃取前后出现了 3 个明显差异峰,这 3 个差异峰可能是 3 种潜在的抗菌肽,有待进一步的分离鉴定。该研究可为后续抗菌肽的靶向筛选提供重要依据。

### 参考文献:

- [1] PETERS B M, SHIRTLIFF M E, JABRA - RIZK M A, et al. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? [J/OL]. PLoS Pathog, 2010, 6(10): e1001067 [2021 - 03 - 08]. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001067>.
- [2] PICHU S, RIBEIRO J M C, MATHER T N. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 390(3): 511 - 515.
- [3] SIERRA J M, FUSTE E, RABANAL F, et al. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development[J]. Expert Opin Biol Ther, 2017, 17(6): 663 - 676.
- [4] JOHNSON E M, JUNG D Y, JIN D Y, et al. Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(16): 2743 - 2767.
- [5] 赵萍. 抗菌肽 polybia - MP II 及其类似物抗菌活性、细胞毒性和酶解稳定性的研究[D]. 兰州:兰州大学,2019.
- [6] 范丽娟,潘道东. 超滤法分离免疫牛初乳中的 IgG[J]. 食品科学,2007, 28(7): 242 - 244.
- [7] 韩玉竹,李平兰,何琴,等. 辣椒籽抗菌肽提取条件优化及分离纯化[J]. 食品科学, 2019, 40(24): 258 - 264.
- [8] 王战勇, 李宁, 苏婷婷. 中国林蛙皮抗菌肽的提取纯化及抑菌活性检测[J]. 食品科学, 2010, 31(3): 132 - 135.
- [9] 潘朋朋, 冯立文, 李吉平, 等. 光滑爪蟾皮肤抗菌肽的分离纯化及活性检测[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(8): 1162 - 1165.
- [10] 贺浪冲,杨广德,耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶活性及其色谱特性[J]. 科学通报, 1999, 44(6): 632 - 637.



价报告,且评价报告中试剂盒评价结果均显示符合 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的快速检测 胶体金免疫层析法》性能指标要求。前期调研情况与质量评价结果的差异更体现了开展质量评价工作的必要性。评价考察发现,胶体金标记的抗原抗体是决定检测效果的关键。后期市场调研发现,C、D 品牌公司具有较好的自主研发能力,能自主研发生产抗原抗体,有品类齐全的抗原抗体库,而 A、B 品牌公司使用的抗原抗体全靠外购。为确保食用油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的快检监管效果,结合试剂盒评价结果和市场调研情况,建议快检试剂盒产品须经质量评价合格再投入使用,并不定期对产品进行跟踪评价。

#### 参考文献:

- [1] 劳文艳,林素珍. 黄曲霉毒素对食品的污染及危害[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2011, 25(1): 64-69.
- [2] 李金. 有害物质及其检测[M]. 北京:中国石化出版社, 2001: 94-100.
- [3] 赵群,丛铎,徐振斌. 粮食中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>检测方法的研究进展与展望[J]. 中国粮食经济, 2015(6): 59-60.
- [4] 黄建锋,姜侃,刘鹏鹏,等. 我国主要食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的调查分析[J]. 食品工业, 2016, 37(3): 295-297.
- [5] 程恒怡,钟延旭,陈杰,等. 广西居民食用植物油黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>膳食暴露评估[J]. 应用预防医学, 2017, 23(6): 451-454.
- [6] 邓幸飞,张燕,陈海燕,等. 花生原料及花生油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的污染分析[J]. 广州化工, 2018, 46(3): 86-87.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. 食用油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>的快速检测 胶体金免疫层析法:KJ 201708[EB/OL]. [2021-02-24]. <http://www.samr.gov.cn/spcjs/ksjcff/index.2.html>.
- [8] 成长玉,张敏,曹进,等. 食品快速检测方法在国内外的应用与管理比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(4): 401-404.
- [9] 叶雅真. 我国食品安全快检产品的现状和对策分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3719-3724.
- [10] 国家食品药品监督管理总局. 总局办公厅关于印发食品快速检测方法评价技术规范的通知:食药监办科[2017]43号[EB/OL]. [2021-02-24]. <http://law.pharmnet.com.cn/laws/detail.4026.html>.
- (上接第 69 页)
- [11] 徐硕,姜文清,邝咏梅,等. 细胞膜色谱技术应用于中药活性成分筛选的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(2): 274-277.
- [12] HOU X F, REN J, WANG S C, et al. Establishment of a high expression of  $\alpha_{1A}$  adrenergic receptor cell membrane chromatography - HPLC method for screening target components from *Radix caulophylli*[J]. Chromatographia, 2010, 72(7/8): 635-640.
- [13] WANG C H, HE L C, WANG N, et al. Screening anti-inflammatory components from Chinese traditional medicines using a peritoneal macrophage/cell membrane chromatography - offline - GC/MS method [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(27): 3019-3024.
- [14] 肖建辉. 麻疯树籽粕脱毒及其抗菌肽的细胞膜色谱制备法和抗菌机理的研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2012.
- [15] 唐亚丽. 家蝇抗菌肽的分离及对细菌壁膜和 DNA 的作用[D]. 江苏无锡:江南大学, 2009.
- [16] 王雪峰,陈越,赵琼,等. 响应面试验优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 173-181.
- [17] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.
- [18] 康洁. 营养型酵母细胞破壁方法的研究[J]. 商丘师范学院学报, 2018, 34(6): 27-33.
- [19] 李连连. 以硅胶为载体的苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体的制备及性质研究[D]. 石家庄:河北科技大学, 2014.
- [20] BILGILI M S. Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by xad-4 resin: isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis [J]. J Hazard Mater, 2016, 137(1): 157-164.
- [21] 唐文婷. 基于肽-膜相互作用的模拟细胞膜法筛选抗菌肽的研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2014.
- [22] 李延盛,伊其光. 超声化学[M]. 北京:科学出版社, 2015.
- [23] HE L C, WANG S C, GENG X D. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54(1): 71-76.
- [24] 刘小花,白海鑫,金秋,等. 壳聚糖-硅胶复合物对刚果红的吸附性能研究[J]. 广州化工, 2018, 46(24): 57-60.