

基于 NHS 基团修饰的副溶血性弧菌免疫磁珠制备及其富集性能评价

刘阳¹, 刘文侠¹, 孙力军^{2*}, 施琦¹, 邱妹¹, 邓旗²

(1. 国家海产品质量监督检验中心(湛江), 广东湛江 524000; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524000)

摘要 [目的] 制备 NHS 基团修饰的副溶血弧菌免疫磁珠并评价其富集性能。[方法] 采用偶联率确定免疫磁珠最佳制备条件(磁珠粒径、偶联时间和抗体加入量), 采用捕捉率确定免疫磁珠最佳富集条件(菌悬液 pH、孵育时间和免疫磁珠加入量), 并通过方法的特异性、灵敏度、精密度和稳定性评价免疫磁珠富集性能。[结果] 0.1 mL N₂ 型 NHS 磁珠可与 0.2 mL 副溶血弧菌抗血清偶联 2 h 制备 IMB_{VP}, 加入到副溶血弧菌悬液(pH 7.0~7.4)中孵育 2 h, IMB_{VP} 最佳工作液体积为 0.4 mL。该方法特异性好、灵敏度高(15 cfu/50 mL)、精密度高(批内变异系数和批间变异系数均在 3%~6%)、稳定性好(准确度大于 91%)。[结论] 自制副溶血弧菌免疫磁珠富集性能好, 方法工作效率高, 成本低, 为副溶血弧菌高效快速检测提供了可靠的富集手段。

关键词 NHS 基团; 副溶血弧菌; 免疫磁珠; 富集

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)06-0001-04

Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* Immunomagnetic Beads Based on NHS Group and Evaluation of Enrichment Capacity

LIU Yang¹, LIU Wen-xia¹, SUN Li-jun² et al (1. National Marine Products Quality Supervision & Inspection Center, Zhanjiang, Guangdong 524000; 2. College of Food Science, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524000)

Abstract [Objective] The aim was to prepare *Vibrio parahaemolyticus* immunomagnetic beads (IMB_{VP}) based on NHS group and evaluate the enrichment capacity. [Method] The best coupling conditions were decided by conjugate ratio, like conditions range from magnetic beads particle diameter, coupling time and the adding amount of antibody. The best enrichment conditions were decided by capture rates, like conditions range from pH, incubation time and the adding amount of IMB_{VP}. The enrichment capacity of IMB_{VP} was evaluated according to specificity, sensitivity, precision and stability. [Result] The IMB_{VP} was prepared by chemical bond, which combined 0.1 mL of NHS bead with size N₂ and 0.2 mL of *Vibrio parahaemolyticus* antiserum. IMB_{VP} was placed into the bacterial suspension which pH was 7.0-7.4. Volume addition of was IMB_{VP} 0.4 mL. They were incubation 2 h together. The method was involved in some advantages, high specificity, sensitivity and accuracy. The detection limit was 15 cfu/50 mL. The CVs of intra and inter assay were between 3% and 6%. The accuracy was greater than 91%. [Conclusion] The above results demonstrate that homemade IMB_{VP} has good enrichment performance. Experiment results show that it is an effective method, convenience, low cost and quickness.

Key words NHS; Group *Vibrio parahaemolyticus*; Immunomagnetic beads; Enrichment

免疫磁珠分离技术是近年发展起来的一项新的免疫学技术^[1]。根据免疫学原理, 副溶血性弧菌抗体在适当的条件下与磁珠偶联后, 可与副溶血性弧菌发生特异性结合, 在外加磁场的作用下, 达到快速分离和富集目标菌的效果。这种高特异性方法可以在较为复杂的环境中有效地收集、浓缩大量样品中的少量目标菌, 从而提高检测效率。目前, 已有学者对副溶血性弧菌免疫磁珠的制备方法进行了研究^[2-4], 但存在 3 个问题: 一是采用国外磁珠 Dynabeads 效果较好, 但是价格昂贵, 超出国内磁珠价格 10 倍; 二是常用磁珠类型为羧基磁珠或氨基磁珠, 在连接抗体前需要对磁珠进行活化, 并且磁珠与抗体偶联的时间较长, 一般需要过夜, 大大影响了免疫磁珠制备的效率; 三是现有研究主要是对 1 mL 样品液进行富集, 没有体现免疫磁珠应用优势。

基于以上问题, 笔者选用 NHS 磁珠作为试验材料, 与副溶血性弧菌抗血清偶联制备免疫磁珠(IMB_{VP}), 优化了免疫磁珠制备条件和孵育条件, 确定了最佳制备和使用方案, 并通过特异性、灵敏性和稳定性试验对副溶血弧菌免疫磁珠富集性能进行了评价, 以期构建副溶血弧菌高效快速的检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 副溶血性弧菌(ATCC33847)、创伤弧菌(ATCC27562)、溶藻弧菌(ATCC 17749)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、单增李斯特菌(ATCC 19115)、铜绿假单胞菌(ATCC9027)、沙门氏菌(CMCC50094)、志贺氏菌(CMCC51572); NHS 磁珠(HRCZ-03N300 粒径为 300 nm, 以下缩写为“N₁”、HRCZ-03N400 粒径为 1 μm, 以下缩写为“N₂”), 洛阳惠尔纳米科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫磁珠的制备。①取 0.1 mL NHS 磁珠, 加入 0.5 mL 洗涤缓冲液(PBST; 0.1 mol/L PBS 溶液含 0.05% 吐温-20, pH 7.4)洗涤 3 次, 置于磁分离器中, 去上清; ②取副溶血弧菌 K II 型抗血清(以下简称“抗血清”)稀释液, 偶联缓冲液(MEST; 15 mmol/L MES, 含 0.05% 吐温-20, pH 6.0)调节体积至 0.4 mL, 混合液室温振荡反应后, 置于磁分离器取上清, 检测偶联率。洗涤缓冲液洗涤 3 次, 置于磁分离器中, 去上清。考马斯亮蓝测定上清液蛋白质含量, 计算抗体蛋白与磁珠偶联率。③加入封阻缓冲液(PBST 含 2% BSA)涡旋 30 s, 将离心管于室温下振荡反应 2 h; ④洗涤后将制备好的免疫磁珠(IMB_{VP})存放于保存缓冲液(PBST 含 0.02% Na₂S₂O₃、1% BSA)中, 4 °C 保存待用。

$$\text{偶联率} = \frac{\text{血清蛋白加入量} - \text{上清液蛋白剩余量}}{\text{血清蛋白加入量}} \times 100\%$$

1.2.2 免疫磁珠对目标菌株的捕获。①将 IMB_{VP} 去上清, 加

基金项目 国家自然科学基金项目(31371746); 广东省质量技术监督局科技项目(2015ZZ02)。

作者简介 刘阳(1986—), 女, 吉林辽源人, 工程师, 硕士, 从事产品质量与安全研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事海产品质量与安全研究。

收稿日期 2017-12-27

入1 mL 副溶血性弧菌悬液,37 °C 振荡反应。②取0.1 mL 上清液涂布弧菌显色培养基,去其他上清液。③取0.5 mL 洗涤缓冲液洗涤 IMB_{VP} 3次,置于磁分离器中,去上清。④加入0.3 mL PBST 混匀后,分别取0.1 mL 混合液涂布3个弧菌显色培养基,37 °C 培养18~24 h 计数,取3个平板菌落数之和。计算原液菌落数和 IMB_{VP} 捕获菌落数,计算捕获率。同时以无菌生理盐水代替菌悬液作为阴性对照。

$$\text{捕获率}(X) = \frac{\text{富集到的菌落数}(\text{cfu}/0.1 \text{ mL})}{\text{原始菌落数}(\text{cfu}/0.1 \text{ mL})} \times 100\%$$

1.2.3 磁珠制备条件的优化。

1.2.3.1 磁珠型号。比较 N₁ 和 N₂ 2种型号磁珠偶联情况。

1.2.3.2 偶联时间。磁珠与抗血清偶联不同时间(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h),比较偶联率,确定最佳偶联时间。

1.2.3.3 抗体加入量。分别比较不同含量抗血清(0.1、0.2、0.3、0.4 mL)与磁珠的偶联率,确定最佳血清加入量。

1.2.4 免疫磁珠捕获目标菌条件的优化。

1.2.4.1 捕获时间。比较免疫磁珠与目标菌在不同孵育时间情况下(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h)对目标菌的捕获率,确定 IMB_{VP} 捕获目标菌最佳时间。

1.2.4.2 孵育溶液 pH。比较不同孵育环境中(pH 分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)免疫磁珠对目标菌的捕获情况。

1.2.4.3 免疫磁珠使用量。比较不同含量 IMB_{VP} (0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mL)对等浓度目标菌的捕获率,确定最佳免疫磁珠使用量。

1.2.5 免疫磁珠捕获性能的测定。

1.2.5.1 特异性。采用 IMB_{VP} 分别分离副溶血性弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、金黄色葡萄球菌、单增李斯特菌、铜绿假单胞菌、沙门氏菌、志贺氏菌,对于副溶血性弧菌疑似菌落进行生化鉴定试验,比较 IMB_{VP} 对不同菌株的富集情况,评价其特异性。

1.2.5.2 灵敏性。将 IMB_{VP} 分别加入到等浓度、不同体积的副溶血性弧菌悬液中(1、10、50 mL)进行富集检测。设置传统菌落计数法作为对照试验。计算捕捉率确定 IMB_{VP} 检测副溶血性弧菌的最低检测限。

1.2.5.3 精确度。将 IMB_{VP} 分别加入浓度范围为 <30 cfu 和 30~300 cfu 副溶血弧菌悬液中,最佳条件下进行批内重复和批间重复(n=5),以其批内变异系数表示批内误差,批间变异系数表示批间误差,系数范围在低浓度点时应 <15%。2个变异系数表示方法的精确程度。

1.2.5.4 准确度。计算多次试验(n=15)结果准确度。准确度(%) = 1 - E%。其中 E% 表示测定结果的相对误差。

2 结果与分析

2.1 免疫磁珠制备最佳条件的确定

2.1.1 磁珠型号对磁珠偶联能力的影响。采用2个型号免疫磁珠加入到等浓度的副溶血弧菌悬液中,N₁型和N₂型免疫磁珠对副溶血弧菌的捕捉率为(50.27 ± 2.39)%和(74.23 ± 1.77)%。因此,确定N₂型磁珠作为后续试验磁珠,由N₂型磁珠制备的免疫磁珠为IMB_{VP}。

2.1.2 偶联时间对磁珠偶联能力的影响。结果表明,时间对偶联率的影响较大。随着磁珠与抗血清偶联时间的延长,磁珠结合抗血清的能力增强,偶联2 h后偶联率达到最大值(79.73 ± 0.79)% (图1)。超过2 h后,磁珠与抗血清偶联率变化幅度较小,并有微弱的降低。这说明长时间的振荡会影响磁珠与抗血清的化学键结合。因此,选取2 h为磁珠与抗血清偶联最佳时间。

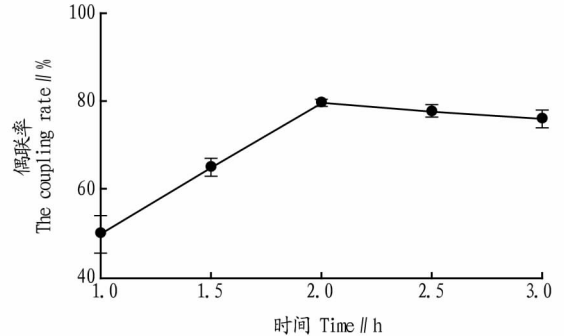


图1 不同偶联时间血清与磁珠的结合量

Fig. 1 Determination of serum coupled with magnetic beads at different time

2.1.3 磁珠对抗血清承载量的确定。结果表明,磁珠对抗血清具有一定的承载能力。随着抗血清含量增加,与磁珠偶联趋于稳定,当抗血清添加量为0.2 mL时,偶联率最高可达(90.82 ± 1.79)% (图2)。当超过磁珠承载量后,溶液中没有结合的血清含量增多,偶联率下降,浪费材料。因此,确定0.1 mL NHS 磁珠可与0.2 mL 抗血清进行偶联制备 IMB_{VP}。

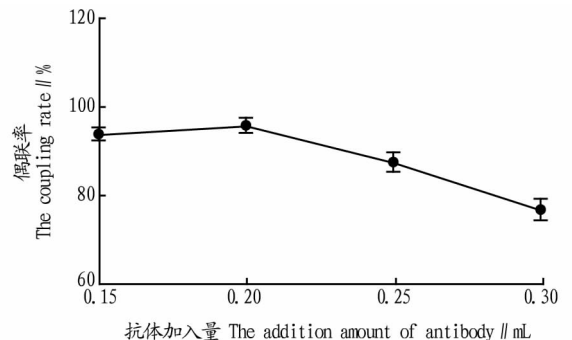


图2 磁珠对抗血清结合能力的确定

Fig. 2 Determination of beads binding ability to serum

2.2 免疫磁珠捕获目标菌株最佳条件的确定

2.2.1 捕获时间对 IMB_{VP} 捕获能力的影响。结果表明,随着免疫磁珠与目标菌孵育时间的延长,捕获率明显提高。当孵育时间达到1.5 h时,捕捉率达到最高,为(88.22 ± 2.68)%。时间延长至2.0 h,捕捉率基本稳定。但当孵育时间超过3.0 h时,捕捉率降低。根据原理,孵育时间过长会降低免疫磁珠的特异性,环境中的杂菌可能会与免疫磁珠相结合,导致捕捉率下降。因此,免疫磁珠与目标菌的孵育时间应在最佳时间范围内(图3)。

2.2.2 孵育液 pH 确定。将副溶血弧菌悬液加入到免疫磁珠工作液中,分别用无菌1 mol/L 盐酸或氢氧化钠调节 pH 至6.0~8.0。结果表明,孵育环境对免疫磁珠的捕获能力影

响很大,酸性或碱性环境中捕获率明显下降。IMB_{VP}与目标菌孵育最佳 pH 为 7.0~7.5(图 4)。

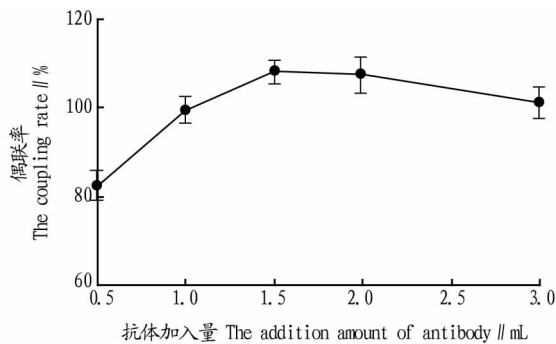


图 3 IMB_{VP}最佳孵育时间的确定

Fig. 3 Determination of the best enrichment time of IMB_{VP}

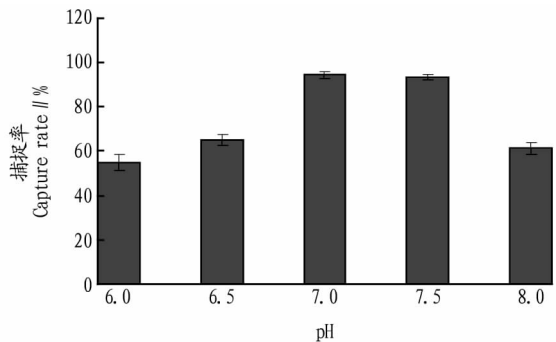


图 4 菌悬液 pH 对 IMB_{VP} 捕获率的影响

Fig. 4 Effect of bacteria suspension at different pH on IMB_{VP} capture

2.2.3 免疫磁珠工作体积的确定。在以上条件优化过程

中,免疫磁珠使用量均为 0.5 mL。虽然捕捉效果较好,但是无法确定免疫磁珠最佳工作体积。为了避免浪费,应根据目标菌的捕捉情况确定最佳工作液体积。因此,该部分测试菌落数分为 2 个部分 <30 cfu 和 30~300 cfu。结果表明,当菌落数 <30 cfu 时,添加 0.2 mL 免疫磁珠得到的菌落数捕获率高于 90%。当菌落数为 30~300 cfu 时,免疫磁珠添加量需要增大到 0.4 mL(图 5)。根据该试验结果,试验人员在使用过程中可以根据菌悬液浓度来选择免疫磁珠的添加量,为后续免疫磁珠捕获性能评价试验做准备。

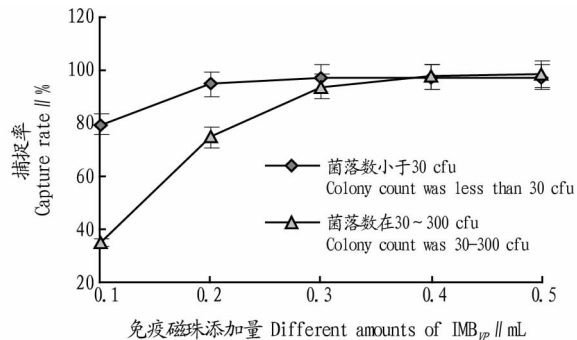


图 5 不同免疫磁珠添加量对捕获率的影响

Fig. 5 Effect of different amounts of IMB_{VP} on capture rate

2.3 免疫磁珠捕获性能的评价

2.3.1 特异性。将最优条件下制备的 IMB_{VP} 分别加入到 8 种标准菌株菌悬液的稀释液中进行捕获试验。结果表明,IMB_{VP} 只捕获副溶血性弧菌,其他菌落在弧菌显色培养基中不生长(表 1)。因此,自制副溶血弧菌免疫磁珠具有高特异性。

表 1 免疫磁珠特异性试验结果

Table 1 Specificity of IMB_{VP}

cfu/mL

序号 No.	菌株 Strains	菌落数 Colony count	免疫磁珠分离菌落数 Isolated colony count of IMB _{VP}	上清液菌落数 Colony count of supernatant
1	副溶血弧菌	278 ± 1.34	270 ± 2.28	9 ± 1.01
2	霍乱弧菌	184 ± 2.48	0	185 ± 3.22
3	溶藻弧菌	204 ± 4.28	0	203 ± 2.19
4	金黄色葡萄球菌	217 ± 3.29	0	210 ± 2.20
5	单增李斯特菌	284 ± 2.10	0	279 ± 1.48
6	铜绿假单胞菌	58 ± 0.29	0	60 ± 1.12
7	沙门氏菌	113 ± 0.83	0	109 ± 2.49
8	志贺氏菌	83 ± 2.48	0	85 ± 1.45

2.3.2 灵敏性。将最优条件下制备的 IMB_{VP} 加入到等浓度、不同体积的副溶血性弧菌菌悬液中,结果表明当 IMB_{VP} 加入到菌悬液中,分离能力会受到样品体积的影响,特别是当菌悬液浓度较低时,捕获率会出现大幅度下降,相应得到的相对误差会增大。由表 2 可知,使用免疫磁珠法的准确性要高于传统计数法。当待测样品体积为 1 mL 时,2 种方法均适用。当待测样品体积为 10 mL 时,免疫磁珠富集目标菌后检测的准确率远远高于传统计数法。当待测样品体积为 50 mL 时,传统计数法的结果已严重偏离。根据结果可以得出,免

疫磁珠富集检测目标菌灵敏度高,检测限可达 15 cfu/50 mL。

2.3.3 精密性。将制备好的 IMB_{VP} 在最优条件下富集副溶血弧菌,通过比较捕获率的批内变异系数和批间变异系数确定方法的精密性(表 3)。结果表明,自制免疫磁珠对副溶血弧菌的检测精密度高,批内变异系数和批间变异系数均在 3%~6%。当菌落数小于 30 cfu/mL 时,批内变异系数和批间变异系数均在标准之内,但相对于其他浓度的变异系数稍大。原因是由于菌落数过少时,基数过小,相对误差增大,使得方差变化剧烈。

表2 免疫磁珠法与传统计数法检测副溶血弧菌灵敏度比较

Table 2 Comparison sensitivity between immunomagnetic beads technique and traditional counting method

待测样品体积 The volume of tested samples//mL	使用方法 Use method	相对误差 The relative error//%	
		菌落数 <30 cfu/mL Colony count was less than 30 cfu/mL	菌落数在 30 ~ 300 cfu/mL Colony count was 30 ~ 300 cfu/mL
1	免疫磁珠法	3.06 ± 0.27	1.93 ± 1.84
	传统计数法	4.88 ± 2.66	2.81 ± 1.23
10	免疫磁珠法	3.74 ± 0.28	4.30 ± 0.55
	传统计数法	20.03 ± 1.57	6.72 ± 2.68
50	免疫磁珠法	4.67 ± 1.54	5.02 ± 0.82
	传统计数法	—	8.58 ± 1.74

表3 IMB_{VP}精确度试验结果Table 3 Precision of V. P isolated by IMB_{VP} %

菌落浓度 Concentration of the colony cfu/mL	批内变异系数 The CVs of intra assay	批间变异系数 The CVs of inter assay
100 ~ 300	3.75 ± 0.49	4.23 ± 0.14
30 ~ <100	3.18 ± 0.38	4.63 ± 0.19
1 ~ <30	5.44 ± 0.57	6.74 ± 0.13

2.3.4 准确性。将制备好的 IMB_{VP} 在最优条件下富集副溶血弧菌,通过考察多次检测结果与真实值之间接近的程度来确定方法的准确性。结果表明,当副溶血弧菌菌悬液浓度在 30 ~ 300 cfu/mL 时,IMB_{VP} 检测准确度为 (94.36 ± 2.18)% ; 当浓度 < 30 cfu/mL 时,IMB_{VP} 检测准确度为 (91.45 ± 4.38)%。综合来看,自制免疫磁珠对副溶血弧菌的检测有较好的准确性。

3 结论与讨论

免疫磁珠在制备过程中通常会受到磁珠类型^[5-6]和制备条件^[7-8]的影响。免疫磁珠的制备实质上是磁珠表面的活性基团与抗体外部基团的结合过程^[9]。活性基团包括羧基、氨基、巯基、甲砷酸基和环氧基等^[10]。为了降低非特异性结合,研究人员又研制了 Protein A/G 磁珠。但是 Protein A/G 磁珠在使用过程中会出现免疫反应,形成背景目标蛋白^[11]。链霉亲和素磁珠也是目前常用磁珠之一^[12]。但是链霉亲和素磁珠在使用前要将抗体进行生物素化。生物素化过程较为繁琐,素化后要对素化效果进行检测,过程繁琐,需要专业人员进行操作。NHS 磁珠是近年来新开发的基于 NHS 基团磁珠,其磁核为纳米四氧化三铁,接有羧基磁珠壳层硅基,然后再连接羧基,最后 NHS 基团修饰。NHS 基团与抗体可形成较为牢固的共价键连接,不易解离。这是该研究采用 NHS 磁珠作为基础材料的重要原因。

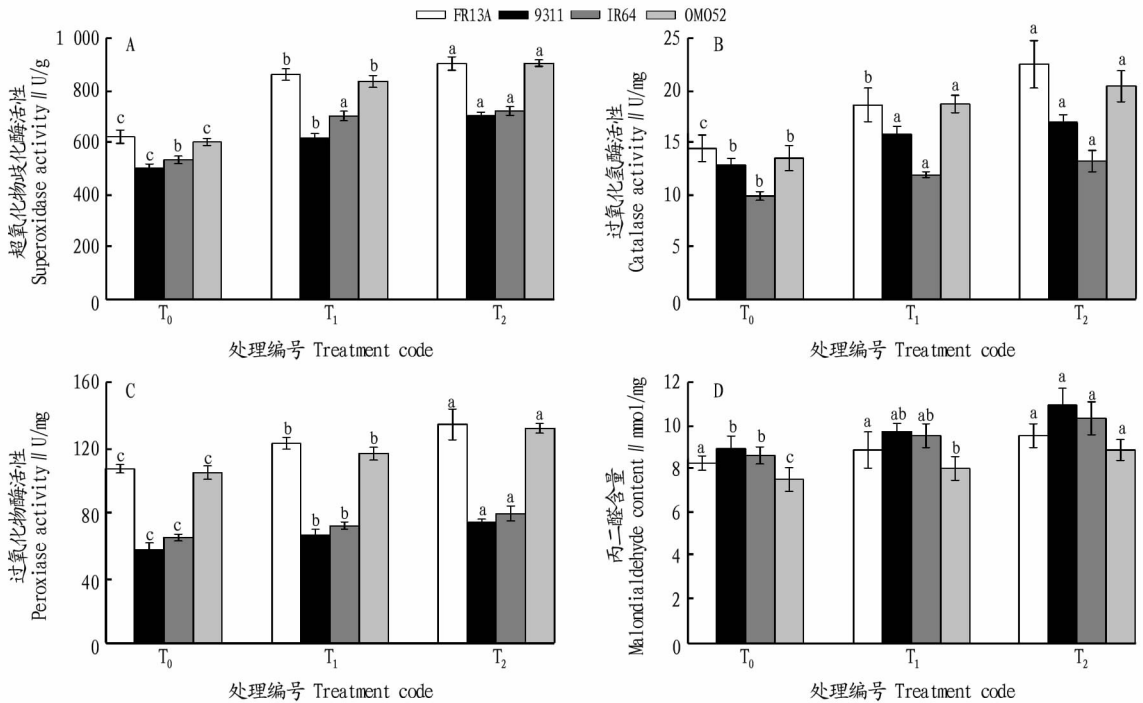
制备条件是成功制备免疫磁珠的重要因素。免疫磁珠的制备条件主要受到磁珠粒径大小^[13]、温度^[14]、活化剂、时间^[15]、pH^[16]、抗体添加量等因素的影响。笔者所在课题组自 2011 年开始对免疫磁珠的制备进行研究^[17-20],根据团队研究成果,参考磁珠类型及成品磁珠说明书建议,该研究主要以磁珠型号、时间和添加量作为免疫磁珠制备的优化因素,经试验确定制备方案,即采用 0.1 mL HRCZ-03N400 型

NHS 磁珠与 0.2 mL 抗血清进行偶联 2 h 可制备副溶血弧菌免疫磁珠。免疫磁珠对副溶血弧菌富集条件的优化也是能够获得良好性能的重要保障。经研究,确定了最佳孵育条件,在 pH 7.0 ~ 7.4 菌悬液中添加 0.4 mL 免疫磁珠孵育 2 h。

通过对免疫磁珠制备条件的优化和捕获目标菌株条件的优化,可获得高特异性免疫磁珠,其最低检测限已达 15 cfu/50 mL,与团队前期研究成果相比提高了 8 倍^[17],突破了传统计数法的局限,大大提高了检测方法的灵敏度、准确度和精密度。另外,该方法制备免疫磁珠的时间为 4 h,与其他类型免疫磁珠制备方法相比,可减少 23 h,大大提高效率。该制备方法成本较低,是国外产品价格的 1/10。该研究自主制备的副溶血弧菌免疫磁珠已申请发明专利,并为免疫磁珠试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献

- [1] UGELSTAD J. Process for preparing an aqueous emulsion or dispersion of a partly water-soluble material, and optionally further conversion of the prepared dispersion or emulsion to a polymer dispersion when the partly water-soluble material is a polymerizable monomer:4,336,173[P]. 1982-06-22.
- [2] 张凡非,杉山宽治,西尾智裕,等. 环境样品中病原性副溶血性弧菌高效检出法[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(3):272-274.
- [3] 苏晨曦,孙晓红,卢瑛,等. 副溶血性弧菌免疫磁珠的制备及其应用[J]. 食品工业科技,2012,33(17):313-316.
- [4] 王报贵,武晓丽,董素琴,等. 副溶血弧菌的磁珠捕获及检测[J]. 食品工业科技,2013,34(13):147-152.
- [5] 梁冰,张雅洁,纪雪,等. 肠出血性大肠埃希菌 O157 免疫磁珠的制备[J]. 中国生物制品学杂志,2017,30(3):278-282.
- [6] 丁浩,苏战强,夏利宁,等. 免疫磁珠富集法对牛源大肠杆菌 O157:H7 分离鉴定的影响[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(4):1189-1194.
- [7] 张尔力. EDC/NHS 法制备免疫磁珠及其效果验证[J]. 化工管理,2016(30):104-105.
- [8] 陈伟,王国民. 免疫磁珠分选前列腺肿瘤细胞的方法优化[J]. 泌尿外科杂志(电子版),2017(2):5-7.
- [9] 闻一鸣,徐金亭,向军俭. 免疫磁珠富集技术进展[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(1):88-92.
- [10] ERATHODIYIL N, YING J Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications[J]. Acc Chem Res, 2011,44(10):925-235.
- [11] MUKTHAPURA A, SHIMOOGGA A, VINODCHANDRAN K, et al. Oxidative products of proteins and antioxidant potential of thiols in gastric carcinoma patients[J]. Journal of medical biochemistry, 2010,29(2):102-106.
- [12] 杨秋萍,何珊珊,王志民. 生物素化 DNA 与链霉亲和素素结合初步研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2016,34(6):9-14.
- [13] CHEN J, PARK B. Effect of immunomagnetic bead size on recovery of foodborne pathogenic bacteria[J]. International journal of food microbiology, 2018,267:1-8.



注:不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercases indicated significant differences ($P < 0.05$)

图2 不同淹水处理对分蘖期水稻叶片超氧化物歧化酶(A)、过氧化氢酶(B)和过氧化物酶(C)活性以及丙二醛含量(D)的影响

Fig.2 Effects of different submergence treatments on superoxidase activity (A), catalase activity (B), peroxidase activity (C) and malondialdehyde content (D) of rice during tillering stage

参考文献

- [1] 李阳生,李绍清.淹涝胁迫对水稻生育后期的生理特性和产量性状的影响[J].武汉植物学研究,2000,18(2):117-122.
- [2] 吕艳艳,金岩,付三雄,等.不同耐淹油菜品种的耐淹性生理差异[J].植物生理学报,2013,49(9):959-967.
- [3] 徐春梅,陈丽萍,王丹英,等.低氧胁迫对水稻幼苗根系功能和氮代谢相关酶活性的影响[J].中国农业科学,2016,49(8):1625-1634.
- [4] XU K N, XU X, FUKAO T, et al. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice [J]. Nature, 2006, 442 (7103): 705-708.
- [5] GONZAGA Z J C, CARANDANG J, SANCHEZ D L, et al. Mapping additional QTLs from FR13A to increase submergence tolerance in rice beyond SUB1 [J]. Euphytica, 2016, 209 (3): 627-636.
- [6] GONZAGA Z J C, CARANDANG J, SINGH A, et al. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice using a population fixed for SUB1A tolerant allele [J]. Molecular breeding, 2017, 37 (4): 47.
- [7] CAMPBELL M T, PROCTOR C A, DOU Y C, et al. Genetic and molecular characterization of submergence response identifies Sub1a as a major submergence tolerance locus in maize [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): 120385.
- [8] HWANG S T, CHOI D. A novel rice protein family of OsHIGDs may be involved in early signalling of hypoxia-promoted stem growth in deepwater rice [J]. Plant cell reports, 2016, 35 (10): 2021-2031.
- [9] DU H, WU N, CUI F, et al. A homolog of ETHYLENE OVERPRODUCER, OsETOLI, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice [J]. Plant journal, 2014, 78 (5): 834-849.
- [10] ANANDAN A, PRADHAN S K, DAS S K, et al. Differential responses of rice genotypes and physiological mechanism under prolonged deepwater flooding [J]. Field crops research, 2015, 172: 153-163.
- [11] 陈永华,赵森,严钦泉,等.不同淹涝胁迫强度对杂交稻和常规稻农艺性状和生化特性的影响[J].中国水稻科学,2006,20(5):512-516.
- [12] 陈永华,严钦泉,肖国樱.水稻耐淹涝的研究进展[J].中国农学通报,2005,21(12):151-153,159.
- [13] 张光恒,曾大力,胡时开,等.水稻苗期耐淹相关性状 QTL 分析[J].作物学报,2006,32(9):1280-1286.
- [14] 陈永华,赵森,柳俊,等.水稻耐淹涝性状的遗传分析和 SSR 标记的研究[J].遗传,2006,28(12):1562-1566.
- [15] 王守立,戴其根,张国良,等.水稻不同品种与秧苗素质耐淹特性的调查[J].扬州大学学报(农业与生命科学版),2008,29(2):67-71.
- [16] 赵启辉.分蘖期淹涝胁迫对水稻农艺和品质性状及生理特性的影响[D].南昌:江西农业大学,2013:39.
- [17] 梁光明,刘阳,孙力军,等.利用免疫球蛋白构建免疫磁珠富集金葡菌条件优化[J].食品与生物技术学报,2013,32(3):265-271.
- [18] 胡莲花.对虾中副溶血性弧菌产毒株的分离识别及抗菌肽的控制效应[D].湛江:广东海洋大学,2012.
- [19] 刘阳.对虾中金葡菌及肠毒素 B 免疫磁快速检测法的建立与应用[D].大连:大连工业大学,2011.
- [20] 黄韵仪,胡莲花,孙力军,等.副溶血性弧菌免疫磁珠偶联条件优化及捕获性能评价[J].微生物学杂志,2012,32(6):7-11.

(上接第4页)

- [14] 喻伟.免疫磁珠的制备及其初步应用[D].武汉:华中农业大学,2010.
- [15] XING J, CHANG Y H, TANG X Q, et al. Separation of haemocyte subpopulations in shrimp *Fenneropenaeus chinensis* by immunomagnetic bead using monoclonal antibody against granulocytes [J]. Fish & shellfish immunology, 2017, 60: 114-118.
- [16] 张凡非,杉山宽治,西尾智裕,等.利用免疫磁珠法分离环境及食品中产生 TDH 副溶血性弧菌的研究[J].中国卫生监督杂志,2004,11(1):7-9.