

## 磁小体的碱性磷酸酶活性分析

徐俊杰<sup>1,2</sup> 王曼曼<sup>1</sup> 刘凌子<sup>2</sup> 李峰<sup>1\*</sup> 田杰生<sup>2\*</sup>

(1. 淮北师范大学 生命科学学院, 淮北 235000;

2. 中国农业大学 生物学院/农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** 为测定磁小体的碱性磷酸酶活性及作为磁性免疫 ELISA 固相载体的可行性, 设置不同显色时间、温度及 pH 条件, 分析比较磁小体与商业化碱性磷酸酶的酶活。结果表明: 商业化碱性磷酸酶显色时间较短, 非常灵敏, 但对温度和 pH 要求严格; 微量的磁小体, 需经过较长的显色时间, 才能使显色剂显色, 但温度和 pH 对磁小体的显色反应影响较小。通过不同的蛋白变性剂进行处理, 表明磁小体的类碱性磷酸酶活性是其表面蛋白作用的结果。但磁小体微弱的显色能力, 在磁性免疫 ELISA 检测时, 没有显著影响。因此, 磁小体可作为磁性免疫 ELISA 的固相载体, 用于免疫检测。

**关键词** 磁小体; 固相载体; 碱性磷酸酶; 磁性免疫 ELISA; 趋磁细菌

中图分类号 Q939.91

文章编号 1007-4333(2018)04-0008-06

文献标志码 A

## Analysis of alkaline phosphatase activity of magnetosome

XU Junjie<sup>1,2</sup>, WANG Manman<sup>1</sup>, LIU Lingzi<sup>2</sup>, LI Feng<sup>1\*</sup>, TIAN Jiesheng<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science, Huaibei normal university, Huaibei 235000, China;

2. College of Biological Sciences/State Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** An experiment was carried out to determine alkaline phosphatase-like activity in magnetosomes and whether the magnetosomes could act as the solid carrier of magnetic immune ELISA. The activity of the magnetosome and the commercial alkaline phosphatase was compared under different coloring time, temperature and pH. The results showed that the time used for the color development of commercial alkaline phosphatase was very short and sensitive. However, the temperature and pH had certain limitations. The trace of the magnetosome required long time in color development, temperature and pH had little effect on the color reaction of magnetosome. Moreover, the location of the magnetophilic alkaline phosphatase on magnetosome was preliminarily determined by the treatment of different protein denaturants. Based on these findings, it was concluded that the weak chromogenic ability of the magnetosome was not significantly affected when it was used for magnetic immunoassay ELISA. Therefore, the magnetosome could be used as a solid carrier for magnetic immune ELISA.

**Keywords** magnetosome; solid phase carrier; alkaline phosphatase; magnetic immune ELISA; magnetotactic bacteria

酶联免疫检测吸附剂测定法(ELISA), 是病原菌检测中最常用的方法。磁性颗粒具有较大的比表面积、相对较高的饱和磁矩以及表面易功能化, 在外加磁场的作用下易吸附, 可重复使用。将人工合成

的磁性颗粒(磁珠)作为固相载体, 构建磁性免疫 ELISA, 已成为一个新兴的研究方向。曹宇等<sup>[1]</sup>将磁珠与酶联免疫吸附剂测定结合, 构建免疫磁性捕获 ELISA 技术, 将其用于松树中松材线虫的检测,

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 中国国家自然科学基金 Grant No. 31570037; 农业生物技术国家重点实验室开放研究重点课题 Grant No. 2015SKLAB6-2

第一作者: 徐俊杰, 硕士研究生, E-mail: 1270756291@qq.com

通讯作者: 李峰, 教授, 主要从事微生物生理及遗传学研究, E-mail: rx2500@163.com; 田杰生, 副教授, 主要从事微生物生理及遗传学研究, E-mail: tianhome@cau.edu.cn

最高检测效率为 94.1%，灵敏度达到 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线虫蛋白抗原。Yu 等<sup>[2]</sup>将磁珠与 ELISA 技术结合，用于低度感染人群中日本血吸虫病的诊断，发现比传统的 ELISA 检测更灵敏，精确度更高<sup>[2]</sup>。与传统的 ELISA 技术相比，免疫磁性 ELISA 技术操作简单，可反复使用，检测效率高，应用范围更广。

目前，人工合成磁珠直径多为微米级，可用于细胞分离<sup>[3-4]</sup>、DNA 提取<sup>[5-6]</sup>和抗原检测<sup>[7]</sup>等方面的生物医学和环境检测。然而，偶联功能性分子，需通过化学偶联剂添加到磁性颗粒表面，步骤较繁琐，需使用大量的化学交联剂，因此市售的磁性颗粒价格比较昂贵，限制了其应用的普及和推广。趋磁螺菌 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 合成的磁小体粒径为 30~50 nm，与磁珠相比，大小均一、晶体结构稳定、磁性强、比表面积更高，且生物相容性好，是理想的生物源磁性纳米载体<sup>[8]</sup>。磁小体核心部分为单磁畴的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  晶体，外层由生物膜包裹，称为磁小体膜，膜上含有多种膜蛋白<sup>[9]</sup>。磁小体的发现，为纳米材料的合成提供了一条全新的途径，在磁性分离、固定化酶、食品检测、环境监测、医学诊断、磁共振成像、磁热疗和靶向治疗等许多领域具有广阔的应用前景<sup>[10]</sup>。此外，通过化学或生物学法，偶联多种功能性分子到磁小体表面，大大扩展了磁小体的应用范围<sup>[11]</sup>。Li 等<sup>[12]</sup>通过化学法，偶联抗沙门氏菌 *Salmonella* 的抗体到磁小体表面，用以检测食品中的沙门氏菌，发现其最低检测限为 0.6 cfu/mL。Matsunaga 等<sup>[13]</sup>首次利用化学的方法偶联单克隆抗体到磁小体表面，用于不同内分泌干扰物质的检测，在检测双酚 A 时，最低检测限为 2.3~2.3 $\times 10^3$  ng/mL。Tanaka 等<sup>[14]</sup>将磁小体抗体复合物与免疫化学发光 ELISA 结合，用于环境水样品中 17 $\beta$ -雌二醇的高效检测，最低检测效率为 20 $\times 10^{-3}$  ng/mL。随后，Wacker 等<sup>[15]</sup>利用磁小体构建免疫磁性-PCR，将其用于乙肝表面抗原 HBsAg 的检测，最低检测限为 320 pg/mL。

采用磁性免疫 ELISA 技术进行化学发光检测时，需对抗原或抗体进行酶标记，常选用的酶为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶<sup>[16-18]</sup>。研究表明，磁性颗粒中的  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  能够催化氧化有机底物降解，具有较高的类过氧化物酶活性<sup>[19]</sup>。因此，在磁性免疫 ELISA 技术中尽量避免使用辣根过氧化物酶标记抗原或抗体，而只能选用碱性磷酸酶。碱性磷酸酶可催化硝基苯磷酸酯，产生对硝基苯酚，在 405 nm

处有最大的吸收峰。但是，关于磁小体是否具有碱性磷酸酶活性的研究尚未报道。而磁小体本身是否具有碱性磷酸酶活性，将直接影响磁性免疫 ELISA 的显色结果。因此，本研究着眼于磁小体，探索其是否具有碱性磷酸酶活性，以期确定其是否可作为磁性免疫 ELISA 的固相载体，进而为磁性免疫 ELISA 技术的应用和推广提供依据。

## 1 试验方法

### 1.1 菌株及培养

本试验选用的菌株为趋磁螺菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1，其培养基及培养条件参考文献<sup>[20]</sup>。将 *M. gryphiswaldense* MSR-1 接种于 50 mL 乳酸钠培养基，进行活化培养，30  $^{\circ}\text{C}$  100 r/min 摇床，培养 24 h。以 10% 的接种量传代于 1 L 的摇瓶，培养 24 h，离心、洗涤并收集细胞备用。

### 1.2 磁小体的纯化及保存

将收集的细胞悬浮于 pH 为 7.4 10 mmol/L 的 PBS 缓冲溶液中，以每克菌泥加入 10 mL 的 PBS 悬浮细胞。超声波破碎机（购于宁波新芝生物科技股份有限公司）进行细胞破碎（200 W，工作 3 s，间隔 5 s，200 次），破碎后的细胞置于磁力架上 4  $^{\circ}\text{C}$  吸附过夜，弃上清。沉淀经超声波进行反复清洗（100 W 工作 3 s，间隔 5 s，100 次），磁力架吸附，BCA 试剂盒检测上清蛋白浓度，直至上清蛋白浓度不再增加。蒸馏水清洗磁小体 2 次，磁力架吸附，将纯化后的磁小体悬浮于蒸馏水中，液氮速冻，冷冻干燥机干燥，-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.3 菌株及磁小体透射电子显微镜 (TEM) 观察

将收集的菌株及纯化后的磁小体，进行超声波清洗 3 次。以 1 mg/mL 的浓度悬浮于去离子水中，超声波彻底混匀，取 10  $\mu\text{L}$  磁小体悬浮液，滴加到铜网表面，静置 10 min，风干铜网，进行透射电子显微镜 (JEM-1230 JEOL Tokyo Japan) 观察。

### 1.4 磁小体的碱性磷酸酶活性检测

分别取 0.25、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mg 的磁小体悬浮于 1 mL PBS 缓冲液中，超声波反复清洗 3 次，磁力架吸附待磁小体富集完全，弃上清，分别加入 10 mg/mL 的碱性磷酸酶反应底物（对硝基苯磷酸二钠）1 mL，悬浮磁小体，超声波混匀，25  $^{\circ}\text{C}$  避光显色 30 min。加入 3 mmol/L NaOH 100  $\mu\text{L}$  终止反应，4  $^{\circ}\text{C}$  磁力架吸附，检测显色后上清 OD<sub>405</sub> 数值。

## 2 结果与分析

### 2.1 磁小体及趋磁细菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1 表征分析

纯化培养的趋磁细菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1 属于  $\alpha$ -变形菌纲 *Magnetosipillum* 属。通

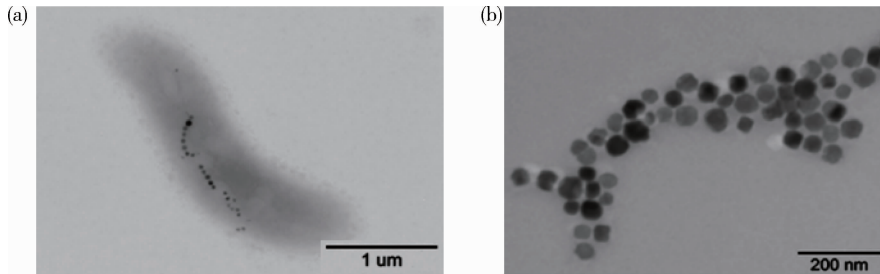


图1 趋磁细菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1(a)和磁小体(b)透射电子显微镜观察结果

Fig. 1 Transmission electron microscope results of *M. gryphiswaldense* MSR-1 (a) and magnetosome (b)

### 2.2 磁小体的碱性磷酸酶活性分析

#### 2.2.1 磁小体的碱性磷酸酶活性检测

分别称取湿重为 0.25、0.50、1.00、2.00 和 4.00 mg 的磁小体,将其与质量浓度为 10 mg/mL 的碱性磷酸酶反应底物 pNPP 进行反应,检测其反应后的  $OD_{405}$ 。结果如图 2(a) 所示,随着磁小体量的增加, $OD_{405}$  数值呈线性增加,表明磁小体具有碱性磷酸酶活性;但微量的磁小体碱性磷酸酶活性较弱,0.25 mg 的磁小体,在显色 30 min 后  $OD_{405}$  为 0.285。然而,在免疫磁性 ELISA 检测时,磁小体用量更少,检测时间更短。因此,磁小体极低的碱性磷酸酶活性,不会影响免疫磁性 ELISA 的检测结果。

#### 2.2.2 磁小体与商业化碱性磷酸酶 (Fast AP) 的酶活比较

质量为 4.00 mg 的磁小体与 0.20 μg Fast AP 进行酶活比较,分别将其与 1 mL 的碱性磷酸酶反应底物进行显色,检测其显色后的  $OD_{405}$ ,结果如图 2(b) 所示,当显色时间为 20 s 时 Fast AP 已将反应底物彻底显色, $OD_{405}$  为 1.25。磁小体的显色较慢,显色 20 s 时, $OD_{405}$  为 0.08。表明磁小体碱性磷酸酶活性较弱,显色时间较长,不会影响商业化 Fast AP 的显色。

#### 2.2.3 温度对磁小体碱性磷酸酶活性的影响

分别称取 4.00 mg 磁小体,在不同温度下与 1 mL 碱性磷酸酶显色底物进行显色,以商业化 Fast AP 为对照,磁小体与底物的反应时间设定为 10 min, Fast AP 与底物的反应时间设定为 1 min。

过透射电镜,可观察到该菌株呈螺旋状,长度约为 160 μm,靠近细胞质膜的位置含有 1 条由 20~25 个磁小体组成的链状结构(图 1(a))。趋磁细菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1 合成的磁小体粒径大小均一,约为 30~45 nm,呈立方八面体形(图 1(b))。

检测其显色后的  $OD_{405}$ ,结果如图 2(c) 所示,当温度高于 50 °C, Fast AP 预热 5 min 失去酶活。磁小体的碱性磷酸酶活性,并未受到影响。

#### 2.2.4 pH 对磁小体碱性磷酸酶活性的影响

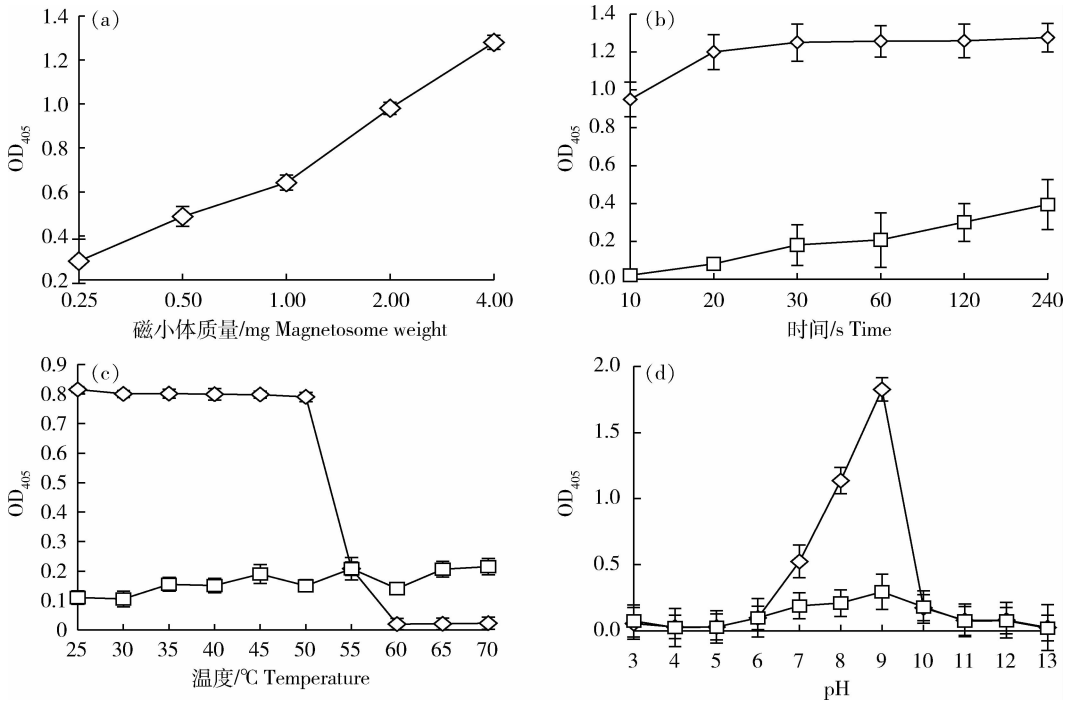
分别称取 0.25 mg 的磁小体,于不同 pH 缓冲液中孵育 3 min,加入碱性磷酸酶反应底物 pNPP,进行不同 pH 下的显色,以商品化 Fast AP 作为对照。检测显色后的  $OD_{405}$ ,结果如图 2(d) 所示,磁小体与 Fast AP 在 pH 为 9.0 时,均表现出较高的碱性磷酸酶活性,磁小体的最高  $OD_{405}$  为 0.295, Fast AP 最高  $OD_{405}$  为 1.825,磁小体的碱性磷酸酶活性远低于 Fast AP。

### 2.3 磁小体的碱性磷酸酶活性位点分析

蛋白酶 K 可切割脂肪族和芳香族氨基酸羧基端的肽键,对多数蛋白质具有水解作用。SDS 是一种表面活性剂,可使蛋白质的氢键和疏水键打开,从而结合到蛋白质表面,使蛋白质变性。脲通过破坏蛋白质间的非共价键,使蛋白变性。经 SDS、脲和蛋白酶 K 处理后的磁小体,将破坏磁小体的膜蛋白。为了检测磁小体的碱性磷酸酶活性位点,分别称取 1.00 mg 的磁小体,进行 SDS、蛋白酶 K 和脲处理。将处理后的磁小体分别与 1 mL 的碱性磷酸酶显色底物进行显色,以未处理的磁小体作为对照,显色结果如图 3(a) 所示。经 SDS、蛋白酶 K 和尿素处理后的磁小体,碱性磷酸酶活性明显降低。表明磁小体的碱性磷酸酶活性位点可能位于磁小体表面的膜蛋白。为了确保磁小体碱性磷酸酶活性位点

于磁小体膜上,而不是  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的氧化作用,我们检测了  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的碱性磷酸酶活性。称取 1.00 mg 的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  与 1 mL 的碱性磷酸酶反应底物,进行显色反应。结果如图 3 (b)所示。反应前后上清无颜色

差异,且检测上清的吸光度,发现反应前后上清的吸光度无变化。表明磁小体的碱性磷酸酶活性位点,位于磁小体膜上,而不是由于磁小体核  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  的氧化作用。

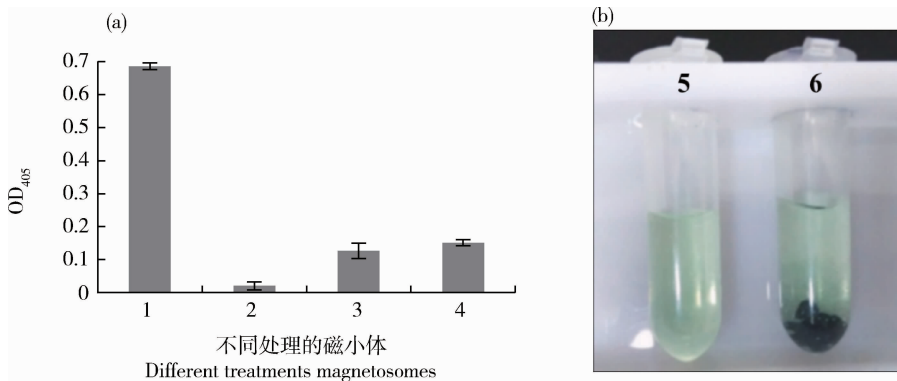


(a) 磁小体的碱性磷酸酶活性检测;(b) 磁小体与 Fast AP 的碱性磷酸酶活性比较;(c) 温度对磁小体碱性磷酸酶活性的影响;(d) pH 对磁小体碱性磷酸酶活性的影响。

(a) Confirm of magnetosomes alkaline phosphatase activity; (b) Comparison of magnetosomes alkaline phosphatase activity Fast AP; (c) Effect of temperature on the magnetosomes alkaline phosphatase activity; (d) Effect of pH on the magnetosomes alkaline phosphatase activity.

图 2 磁小体的碱性磷酸酶活性分析

Fig. 2 The alkaline phosphatase activity analysis of magnetosomes



1. 未处理的磁小体;2. SDS 处理后的磁小体;3. 蛋白酶 K 处理后的磁小体;4. 脲处理后的磁小体;5. 碱性磷酸酶显色液;6.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  与碱性磷酸酶显色液显色。

1. Undigested magnetosomes; 2. Digested by SDS; 3. Digested by proteinase K; 4. Digested by urea; 5. Alkaline phosphatase substrate; 6. Mixture of alkaline phosphatase substrate and  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

图 3 不同处理对磁小体碱性磷酸酶活性的影响 (a) 和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  碱性磷酸酶活性分析 (b)

Fig. 3 The impact of different treatment to magnetosomes alkaline phosphatase activity (a) and alkaline phosphatase activity analysis of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b)

### 3 讨 论

本试验分析了磁小体的碱性磷酸酶活性,发现磁小体的碱性磷酸酶活性极弱,远低于商业化碱性磷酸酶。温度和 pH 对磁小体的碱性磷酸酶活性影响较小。对磁小体进行不同方式的蛋白质变性或水解处理,磁小体的碱性磷酸酶活性明显减弱,因此推断磁小体的碱性磷酸酶活性位点可能位于磁小体膜上。

碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶都是 ELISA 最常用的酶,这 2 种酶标记抗体时的检测灵敏度接近,但后者的反应底物邻苯二胺是较强的致癌试剂,有环境风险。因此碱性磷酸酶标记抗体,更为安全,甚至在包虫病 ELISA 试验中,碱性磷酸酶比辣根过氧化物酶的结合物,检测包虫病的阳性检出率高<sup>[21]</sup>。根据本研究,磁小体具有极低的碱性磷酸酶活性,且显色时间长,不会干扰磁性免疫 ELISA 的正常显色。因此,在磁性免疫 ELISA 技术的应用过程中,碱性磷酸酶比辣根过氧化物酶更具有优势。

天然磁小体表面带有大量的蛋白和脂类成分,提供了可用于偶联功能化分子的氨基基团。日本东京农工大学的松永是开创了磁小体应用的先河,选用化学偶联剂如戊二醛、双琥珀酰亚胺辛二酸酯钠盐(BS<sup>3</sup>)、链霉亲和素等偶联各种功能化分子到磁小体表面,实现了磁小体的应用推广<sup>[22-23]</sup>。但化学修饰存在缺陷性,交联剂价格昂贵,偶联条件苛刻易造成磁小体膜的破坏和功能化分子活性的丢失,且偶联到磁小体膜上的功能化分子不具有方向性,排列杂乱。为了克服这些缺陷,构建磁小体的生物学修饰,其通过遗传重组的方法在磁小体膜上表达所需的特定的蛋白,直接得到功能化的磁小体<sup>[24]</sup>。Xu 等<sup>[25]</sup>将 Protein A 蛋白与磁小体膜蛋白 Mam F 融合展示在磁小体表面,结合实时荧光定量 PCR 法对副溶血弧菌进行检测,其检测限可达  $1.74 \times 10^8$  个/mg 重组磁小体 BMP- $\Delta$ F-FA。目前本实验室已实现趋磁螺菌 *M. gryphiswaldense* MSR-1 的发酵罐培养<sup>[26]</sup>,并且建立了批量磁小体纯化的方法<sup>[27]</sup>,为磁小体的应用奠定基础。将磁小体与酶联免疫吸附剂测定法结合,构建免疫磁性 ELISA 技术,极大地扩展了磁小体的应用范围,使 ELISA 技术操作流程简化,增加其检测灵敏度。

### 参考文献 References

- [1] 曹宇,李海燕,马洪周,胡加付,杨文博,王玉研,白钢. 免疫磁性捕获 ELISA 技术在松材线虫检测中的应用[J]. 林业科学研究, 2005, 18(5): 585-589  
Cao Y, Li H Y, Ma H Z, Hu J F, Yang W B, Wang Y Y, Bai G. Application of immune magnetic ELISA in detection of *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. *Forestry Science Research*, 2005, 18(5): 585-589 (in Chinese)
- [2] Yu Q, Yang H, Feng Y M, Zhu Y H, Yang X L. Magnetic affinity enzyme-linked immunoassay for diagnosis of *Schistosomiasis Japonicum* in persons with low-intensity infection[J]. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012, 87(4): 689-693
- [3] Dembic Z, Rottingen J A, Dellacasagrande J, Schenck K, Bogen B. Phagocytic dendritic cells from myelomas activate tumor-specific T cells at a single cell level[J]. *Blood*, 2001, 97(9): 2808-2814
- [4] Kuhara M, Takeyama H, Tanaka T, Matsunaga T. Magnetic cell using antibody binding with protein A expressed on bacterial magnetic particles[J]. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(21): 6207-6213
- [5] Davies M J, Taylor J I, Sachsinger N, Bruce I J. Isolation of plasmid DNA using magnetite as a solid-phase adsorbent[J]. *Analytical Biochemistry*, 1998, 262(1): 92-94
- [6] Matsunaga T, Okamura Y, Tanaka T. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(14): 2099-2105
- [7] Fan A P, Lau C W, Lu J Z. Magnetic bead-based chemiluminescent metal immunoassay with a colloidal gold label[J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(10): 3238-3242
- [8] Araujo A C, Abreu F, Silva K T, Bazylnski D A, Lins U. Magnetotactic bacteria as potential sources of bioproducts[J]. *Marine Drugs*, 2015, 13(1): 389-430
- [9] Schüler D. Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32(4): 654-672
- [10] Jacob J J, Suthindhiran K. Magnetotactic bacteria and magnetosomes—scope and challenges[J]. *Materials Science & Engineering C*, 2016, 68: 919-928
- [11] 李爱华,唐涛,张惠媛,汪琦,田杰生,李颖. 细菌磁小体的修饰及其在病原体检测中的应用[J]. 生物物理学报, 2010, 26(8): 680-690  
Li A H, Tang T, Zhang H Y, Wang Q, Tian J S, Li Y. Modification of bacterial magnetosome and its application in pathogen detection[J]. *Journal of Biophysics*, 2010, 26(8): 680-690 (in Chinese)
- [12] Li A H, Zhang H, Zhang X, Wang Q, Tian J S, Li Y, Li J L. Rapid separation and immunoassay for low levels of

- Salmonella* in foods using magnetosome-antibody complex and real-time fluorescence quantitative PCR [J]. *Journal of Separation Science*, 2010, 33(21):3437-3443
- [13] Matsunaga T, Ueki F, Obata K, Tajima H, Tanaka T, Takeyama H, Goda Y, Fujimoto S. Fully automated immunoassay system of endocrine disrupting chemicals using monoclonal antibodies chemically conjugated to bacterial magnetic particles[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 475(1-2):75-83
- [14] Tanaka T, Takeda H, Ueki F, Obata K, Tajima H, Takeyama H, Goda Y, Fujimoto S, Matsunaga T. Rapid and sensitive detection of 17 $\beta$ -estradiol in environmental water using automated immunoassay system with bacterial magnetic particles[J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 108(2):153-159
- [15] Wacker R, Ceyhan B, Alhorn P, Schueler D, Lang C, Niemeyer C M. Magneto Immuno-PCR: A novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 357(2):391-396
- [16] Song X, Shukla S, Lee G, Park S, Kim M. Detection of *Cronobacter* Genus in powdered infant formula by enzyme-linked immunosorbent assay using anti-*Cronobacter* antibody [J]. *Frontiers in Microbiology*, (2016-07-21) DOI: 10. 3389/fmicb. 2016. 01124
- [17] Abdel-Rahman E H, El-Jakee J K, Hatem M E, Ata N S, Fouad E A. Preparation of goat and rabbit anti-camel immunoglobulin G whole molecule labeled with horseradish peroxidase [J]. *Veterinary World*, 2017, 10(1):92-100
- [18] Beyzavi K, Hampton S, Kwasowski P, Fickling S, Marks V, Clift R. Comparison of horseradish peroxidase and alkaline phosphatase-labelled antibodies in enzyme immunoassays[J]. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1987, 24:145-152
- [19] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, Zhang J B, Zhang Y, Gu N, Wang T H, Feng J, Yang D L, Perrett S, Yan X Y. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles[J]. *Nature*, 2007, 2(9):577-583
- [20] Sun J B, Zhao F, Tang T, Jiang W, Tian J S, Li Y, Li J L. High-yield growth and magnetosome formation by *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 in an oxygen-controlled fermentor supplied solely with air [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(3):389-397
- [21] 李华, 苏东明, 温博贵. 碱性磷酸酶辣根过氧化物酶结合物在包虫病 Elisa 中比对应用[J]. 江西医学院学报, 1988, 28(1):19-21
- Li H, Su D M, Wen B G. Alkaline phosphatase horseradish peroxidase conjugates are used in the hydatid disease Elisa [J]. *Journal of Jiangxi Medical College*, 1988, 28(1):19-21 (in Chinese)
- [22] Matsunaga T, Kamiya S. Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 26(4):328-332
- [23] Matsunaga T, Okamura Y, Tanaka T. Biotechnological application of nano-scale engineered bacterial magnetic particles[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2004, 14(14):2099-2105
- [24] Sun J B, Li Y, Liang X J, Wang P C. Bacterial magnetosome: A novel biogenetic magnetic targeted drug carrier with potential multifunctions[J]. *Journal of Nanomaterials*, (2011-07-12) DOI:10. 1155/2011/4690314
- [25] Xu J, Hu J Y, Liu L Z, Li L, Wang X, Zhang H, Jiang W, Tian J S, Li Y, Li J L. Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes[J]. *Front Microbiol*, (2014-04-03) DOI:10. 3389/fmicb. 2014. 00136
- [26] Zhang Y, Zhang X J, Jiang W, Li Y, Li J L. Semicontinuous culture of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 cells in an autofermentor by nutrient-balanced and isosmotic feeding strategies [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, (2011-07-01) DOI:10. 1128/AEM. 05962-11
- [27] Sun J B, Duan J H, Dai S L, Ren J, Guo L, Jiang W, Li Y. Preparation and anti-tumor efficiency evaluation of doxorubicin-loaded bacterial magnetosomes: Magnetic nanoparticles as drug carriers isolated from *Magnetospirillum gryphiswaldense*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(6):1313-1320

责任编辑:吕晓梅