

人工表达 β_2 肾上腺素受体的 β 激动剂多残留检测

胡梦华^{1,2}, 王晶¹, 余秋颖¹, 张浩¹, 樊剑鸣², 王方雨¹

(1. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 郑州河南 450002) (2. 郑州大学公共卫生学院, 郑州河南 450001)

摘要: 为提高人工表达的 β_2 肾上腺素受体 (β_2 adrenergic receptor, β_2 AR) 蛋白的活性并对其进行活性鉴定, 利用分子对接技术将 β_2 AR 与 15 种 β 受体激动剂进行柔性分子对接, 依据筛选出的与 β 受体激动剂结合力较好的 β_2 AR 分子结构, 人工合成和改造 β_2 AR 基因, 构建重组表达质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3), 表达出具有活性的受体蛋白。SDS-PAGE 鉴定结果显示, 受体蛋白大小在 47 ku 左右。活性鉴定结果显示, 与克伦特罗、莱克多巴胺及非诺特罗均能够特异性结合, OD 值分别为 0.45、0.32、0.36, 受体蛋白与激动剂的结合力与其活性鉴定结果基本一致。标准检测曲线结果显示, 受体蛋白对 β 受体激动剂类药物具有一定检测能力。利用分子对接技术, 成功获得一定活性的 β_2 AR 受体蛋白, 为 β_2 AR 在 β 受体激动剂多残留检测中的应用奠定了基础。

关键词: β_2 肾上腺素受体; BL21 大肠杆菌; 蛋白表达; 纯化

文章编号: 1673-9078(2018)07-235-240

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.035

Mutiresidue Detection of β Aceptor Agonists in β_2 Adrenergic Receptor by Artificial Expression

HU Meng-hua^{1,2}, WANG Jing¹, YU Qiu-ying¹, ZHANG hao¹, FAN Jian-ming², WANG Fang-yu¹

(1.Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

(2.College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: This study was directed to improve the activity of β_2 adrenergic receptor and to identify the activity of β_2 adrenergic receptor by artificial expression. We used molecular docking technology to separately model the interaction between β_2 adrenergic receptor and fifteen kinds of β receptor agonists. Based on the molecular structure of β_2 adrenergic receptor, the β receptor agonists with best binding in molecular docking was selected, and the β_2 adrenergic receptor gene was synthesized and optimized. The recombinant expression plasmid was constructed to be transferred to Escherichia coil BL21(DE3), which expressed the active receptor protein successfully. SDS-PAGE of recombinant expression plasmid showed that the β_2 adrenergic receptor protein was approximately 47 ku. The results of the receptor activity showed that the receptor protein was capable of specific reaction with Clenbuterol, ractopamine, and fenoterol respectively. OD values were 0.45, 0.32 and 0.36 respectively, and the binding ability of the receptor protein and β receptor agonists was consistent with the results of the activity identification basically. Testing curve shows that β_2 adrenergic receptor protein have the ability to detect β receptor agonists. Using molecular docking technology, we successfully obtained the active β_2 adrenergic receptor protein, which laid the foundation for the application of β_2 adrenergic receptor to the multiresidue detection of β receptor agonists.

Key words: β_2 adrenergic receptor; *Escherichia coil* BL21; protein expression; purification

β 肾上腺素受体激动剂 (俗称“瘦肉精”) 的违禁添加一直是威胁我国人群健康的问题之一, 严重影响畜类食品安全和养殖业的健康发展^[1]。尤其近年来添加剂的混合使用以及新型结构类似物的出现增加了检测的难度, 因此开发一种 β 受体激动剂多残留快速检测技术成为了迫切需求。受体分析法是一种针对结构

收稿日期: 2018-01-03

基金项目: 河南省农业科学院优秀青年科技基金项目 (2016YQ27); 2016 年度河南省高层次人才国际化培养项目; 国家自然科学基金项目 (31372453)

作者简介: 胡梦华, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全快速检测技术

通讯作者: 王方雨, 男, 副研究员, 研究方向: 生物技术

功能相似的目标物的类特异性快速检测方法, 可实现 β 受体激动剂类药物的多残留检测以及对未知物的筛查^[2]。作为受体分析的核心识别元件, 体外表达的 β_2 肾上腺素受体 (β_2 adrenergic receptor, β_2 AR) 的活性和纯度一直是研究焦点。现有的研究表明, 在大肠杆菌^[3]、酵母^[4]、昆虫细胞^[5]、哺乳动物细胞^[6]和无细胞表达系统^[7]等均能得到具有一定活性的受体蛋白, 但表达量及蛋白活性在不同的表达系统中具有差异性。

分子对接技术是根据配体与受体作用的“锁钥原理” (lock and key principle), 模拟它们的相互作用,

使两者结合形成低能构象,是药物虚拟筛选的重要手段^[8]。实验表明,通过分子对接技术,可对多种乙酰胆碱酯酶与不同农药分子的敏感性进行了虚拟筛选^[9];利用构建的GPCRs模型可以捕捉结合口袋的关键化学结构特点^[10];可用于筛选抗HIV-1逆转录酶活性化合物^[11],在中药研究方面也有其独特的优势^[12,13]。

本研究利用分子对接技术,对 β_2 AR受体蛋白的分子结构进行优化,基于优化后的分子结构人工合成基因,利用常见的大肠杆菌表达系统,将成功构建的重组表达质粒,转入BL21大肠杆菌,经IPTG诱导表达后,将诱导表达的受体蛋白利用组氨酸标签蛋白纯化磁珠进行蛋白纯化,并对纯化后受体蛋白进行活性鉴定,为建立基于受体分析法的 β 激动剂快速检测技术奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

pET32a质粒由本实验室保存;BL21(DE3)感受态细胞,购自天根生化科技(北京)有限公司;JM109感受态细胞,购自Takara公司。

1.2 试剂和材料

T4连接酶和ExTaq酶购自宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶Nde I和Xho I购自美国NEB公司;小提质粒试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒购自上海索宝生物科技有限公司;组氨酸标签蛋白纯化磁珠购自海狸生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的克隆特罗来自Sigma公司;羊抗鼠二抗、His鼠源单克隆抗体购自Qiagen公司。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS, 0.01 mol/L); PBST洗液(PBS:Tween20=2×10³:1),包被缓冲溶液(carbonate buffered saline, CBS, 0.05 mol/L NaHCO₃/Na₂CO₃缓冲液),封闭液(PBST:BSA=100:1),终止液(2 mol/L H₂SO₄);其他常规试剂均为国产分析纯级别。

1.3 方法

1.3.1 分子对接

对接所需的 β 受体激动剂分子结构均从ZINC上下载, β_2 AR蛋白分子结构(2RH1),从PDB数据库中下载。依据2RH1的分子结构,对接口袋设定为包含Asp113、Asn312、Ser203、Phe193、Phe289、Phe290、Val114、Val117、Trp109、Tyr308、Tyr316、Tyr199、Trp286和Thr118残基的区域,Threshold定义为0.50,

Bloat定义为10A。以上述蛋白的对接区域作为受体,以 β 受体激动剂类小分子药物作为配体,借助SYBYL软件中FlexX方法进行对接工作,对接前先对 β_2 AR进行系列优化:提取出配体分子对侧链的修补、主链末端的处理,加氢、删除水分子、指定原子类型、加电荷和能量优化等均按SYBYL默认值进行系列优化;利用SYBYL软件的蛋白质对接下面的Define来生成对接活性口袋,其它条件按SYBYL默认值。以对接结果中总评分值(Total Score)为最终判断对接结果的依据。

1.3.2 重组质粒的构建与鉴定

依据对接实验中 β_2 AR受体蛋白的分子结构,将人工合成并改造的 β_2 AR基因PCR扩增后与表达载体pET32a分别用Nde I和Xho I进行双酶切,利用琼脂糖凝胶电泳切胶回收目的片段和载体片段。在T4连接酶的作用下,16℃连接过夜。将阳性重组质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,验证读码框的正确性。序列正确的重组质粒命名为pET32a- β_2 AR₁,并将重组质粒转入BL21大肠杆菌。挑选氨苄阳性的单菌落摇菌,用于目的蛋白的表达。

1.3.3 表达条件的优化及鉴定

将筛选出的BL21大肠杆菌菌液二次活化后1:100接入加入氨苄抗性的LB培养基,37℃,220 r/min,振荡培养3 h,至细菌生长对数期(OD=0.6~0.9)。取出一部分菌液作为阴性对照,余下的菌液按终浓度为1 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.6 mmol/L和0.4 mmol/L加入诱导剂IPTG,37℃,诱导14 h后,将诱导表达的菌液超声破碎,将破碎后菌液进行SDS-PAGE鉴定,检测诱导表达的情况。

1.3.4 蛋白纯化及活性鉴定

在2 mL EP管中加入1 mL菌液上清,组氨酸标签蛋白纯化磁珠400 μ L,4℃环境下,在摇床上结合反应1 h,在磁力架上进行磁性分离,保存分离液,并用浓度10 mmol/L~500 mmol/L的咪唑洗脱液洗脱受体蛋白,收集不同浓度咪唑洗脱液并进行SDS-PAGE检测。将含有受体蛋白的洗脱液用透析液进行梯度透析,得到纯化蛋白。CBS包被纯化后受体蛋白,5%BSA封闭液封闭过夜,ELISA检测目的蛋白的活性。

1.3.5 多残留检测曲线建立

纯化蛋白1:1稀释后包被在酶标板,50 μ L/孔。加入梯度稀释的克隆特罗、莱克多巴胺和非诺特罗3种 β 受体激动剂标准品(0 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL),50 μ L/孔。同时加入1:500稀释的HRP-克隆特罗,50 μ L/孔。37℃,30 min, PBST洗板,加入显色液,100 μ L/孔,显色

10 min, 加入终止液, 50 μ L/孔, 终止反应, 酶标仪测各孔 OD 值。

1.3.6 交叉反应率的测定

根据标准曲线中的标准曲线公式, 得到 3 种 β 受体激动剂的 IC_{50} 值, 计算 3 种 β 受体激动剂的交叉反应率 (CR)。

计算公式: $CR = [IC_{50}(\text{克伦特罗}) / IC_{50}(\beta \text{ 受体激动剂})]$

2 结果与分析

2.1 分子对接结果

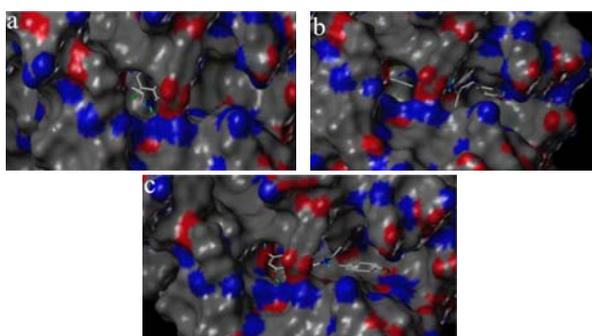


图1 β_2AR 与 β 受体激动剂类药物分子对接模型图

Fig.1 Modeling diagram of β_2AR and β adrenergic receptor agonists by molecular docking

注: a、 β_2AR 与克伦特罗; b、 β_2AR 与莱克多巴胺; c、 β_2AR 与非诺特罗。

表 1 分子对接结果

Table 1 Result of molecular docking

β 受体激动剂类 药物	英文全称	CAS	Total Score
多巴酚丁胺	Dobutamine	34368-04-2	7.5982
非诺特罗	Fenoterol	13392-18-2	7.3290
莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7	6.8865
沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9	5.7219
吡布特罗	Pirbuterol	38677-81-5	5.5702
特布他林	Terbutaline	23031-25-6	5.7557
马布特罗	Mabuterol	56341-08-3	5.0646
奥西那林	Orciprenaline	586-06-1	5.8766
克伦特罗	Clenbuterol	129138-58-5	4.5850
溴布特罗	Brombuterol	41937-02-4	4.5829
异丙肾上腺素	Isoproterenol	7683-59-2	5.8632
西马特罗	Cimaterol	54239-37-1	5.2559
肾上腺素	Adrenaline	51-43-4	5.4472
氯丙那林	Clorprenaline	3811-25-4	5.1257
苯基乙醇胺	Phenylethanolamine	7568-93-6	4.6572

β_2AR 蛋白分子结构 (2RH1) 与 15 种 β 受体激动

剂进行分子对接后, 以总评分值 (Total Score) 作为判断对接结果的依据, 分子对接图如图 1 所示, 分子对接结果如表 1 所示, β_2AR 受体蛋白在分子结构上能与多种 β 受体激动剂结合, 并且其结合能力具有差异性。

2.2 重组表达质粒的鉴定

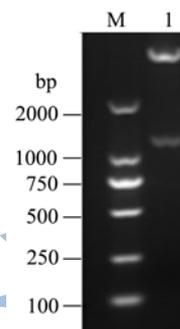


图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定

Fig.2 Double enzyme digestion of recombinant expression plasmid

注: 1、DL2000; 2、pET32a- β_2AR_1 酶切产物。

用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 对重组表达质粒 pET32a- β_2AR_1 进行酶切鉴定, 结果如图 2 所示, 重组质粒经酶切之后出现两个条带, 在 1500 bp 左右出现目的条带为 β_2AR 基因片段, 与预期片段大小相符, 另一条为载体 pET32a 基因片段。

2.3 表达条件的优化及鉴定

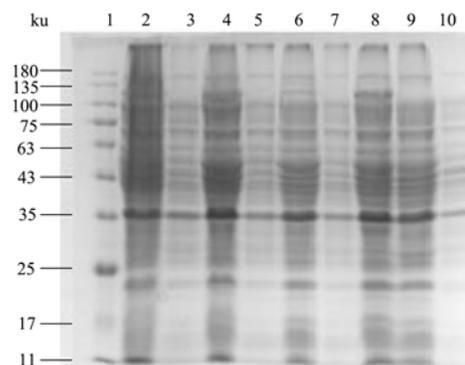


图 3 重组质粒诱导表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 SDS-PAGE image of recombinant expression plasmid

注: 1、180Marker; 2、1 号菌诱导产物; 3、1 号菌未诱导产物; 4、2 号菌诱导产物; 5、2 号菌未诱导产物; 6、3 号菌诱导产物; 7、3 号菌未诱导产物; 8、4 号菌诱导产物; 9、4 号菌未诱导产物; 10、pET32a 空质粒菌液。

将重组表达质粒转入 BL21 大肠杆菌, 挑选 Amp 阳性的单菌落摇菌, 分别标记为 1 号菌, 2 号菌, 3 号菌和 4 号菌, 诱导温度设置为 37 $^{\circ}$ C, IPTG 的浓度设置为 1 mmol/L, 0.8 mmol/L, 0.6 mmol/L 和 0.4

mmol/L, 将诱导和未诱导表达后的菌液超声破碎后, SDS-PAGE 检测结果如图 3 所示, 诱导后的 1 号和 2 号菌在 47 ku 左右条带明显, 3 号和 4 号菌诱导后有目的蛋白的表达, 但是条带不明显。

2.4 蛋白纯化及活性鉴定

2.4.1 表达蛋白的纯化

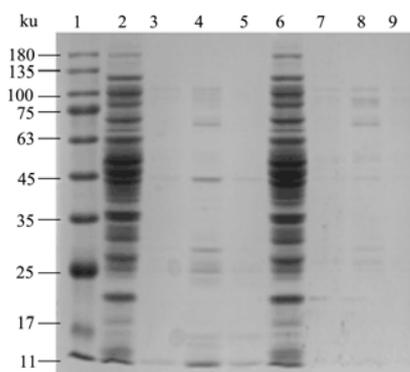


图 4 不同咪唑浓度洗脱蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE image of purified porcine β_2AR protein eluted with different imidazole concentration

注: 1、180 Marker; 2、1 号菌分离液; 3、1 号菌 50 mmol/L 咪唑; 4、1 号菌 300 mmol/L 咪唑; 5、1 号菌 400 mmol/L 咪唑; 6、2 号菌分离液; 7、2 号菌 50 mmol/L 咪唑; 8、2 号菌 300 mmol/L 咪唑; 9、2 号菌 400 mmol/L 咪唑。

选取诱导表达较好的 1 号, 2 号菌液, 经超声破碎、离心后留取上清, 加入 400 μ L 的磁珠进行蛋白的纯化, 用不同浓度的咪唑洗脱液经 SDS-PAGE 检测后如图 4 所示, 菌液均在浓度为 300 mmol/L 咪唑洗脱液下纯化出蛋白。

2.4.2 纯化蛋白的活性鉴定

将纯化后的受体蛋白采用 ELISA 方法进行其活性鉴定, 受体蛋白与辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的克伦特罗、莱克多巴胺及非

诺特罗均能够特异性结合, 结果如表 2 所示, pET32a- β_2AR_1 表达的受体蛋白与三种激动剂的结合力最高的是 IPTG 为 1 mmol/L, OD 值分别为 0.45、0.32、0.36。

2.4.3 多残留检测曲线建立

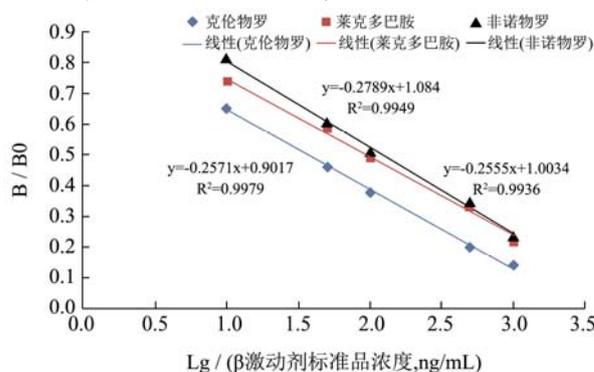


图 5 不同激动剂的检测曲线图

Fig.5 Testing curve of different β receptor agonists

包被纯化后的蛋白, ELRA 方法检测受体蛋白对三种激动剂的检测能力, 测得 OD 值以 B/B0 为纵坐标, 以每种 β 受体激动剂浓度的对数值为横坐标, 建立检测标准曲线。结果如图 5 所示, R^2 均大于 0.9, 受体蛋白对克伦特罗、莱克多巴胺及非诺特罗均表现出一定检测能力, 尤其对克伦特罗的检测能力最高。

2.4.4 交叉反应率测定

3 种 β 受体激动剂的标准曲线公式和 R^2 值分别列出, 计算它们的 IC_{50} 值, 得到交叉反应率。结果如表 3 所示, 莱克多巴胺和非诺特罗与克伦特罗的交叉反应率分别为 5.45% 和 66.16%。说明本次实验中表达的受体蛋白对 β 受体激动剂有一定的检测能力。

表 2 表达蛋白活性鉴定结果

Table 2 Result of molecular docking

酶标抗原种类 包被蛋白种类	HRP-克伦特罗	HRP-莱克多巴胺	HRP-非诺特罗
1 号菌液	0.45	0.32	0.36
2 号菌液	0.40	0.31	0.37

表 3 交叉反应率测定结果

Table 3 Determination of 3 β adrenergic agonists of by ELRA

β 体激动剂种类	标准曲线方程	R^2 值	IC_{50} 值/ $(\mu$ g/L)	交叉反应率(CR)
克伦特罗	$y = -0.2834x + 0.9415$	0.9954	36.00	100%
莱克多巴胺	$y = -0.2493x + 1.1586$	0.9033	660.69	5.45%
非诺特罗	$y = -0.1994x + 0.8461$	0.9131	54.41	66.16%

目前针对动物源性食品中多种 β 受体激动剂残留

量检测,主要包括确证分析法和快速检测法两类。国家标准中规定了液相色谱-串联质谱的测定方法,属于确证分析方法^[14-16]。具有耗时长、成本高、难以实现现场检测等缺点。基于免疫学技术的快速检测方法^[17-20]只能针对特定的 β 受体激动剂进行检测,因此不能满足市场对快速检测的需求。基于受体分析法的快速检测虽能对 β 受体激动剂类药物进行检测,目前还处在研究阶段^[21,22]。

近年来,分子对接技术在药物^[23]、化学^[24]及其他领域^[25]得到迅速发展,随着GPCRs模型的建立及 β_2 AR蛋白分子结构的发现,对它们的研究内容也更加广泛^[26]。基于这些研究,本实验对 β_2 AR蛋白与 β 受体激动剂的相互作用进行分析,利用分子对接技术实现 β_2 AR基因的人工改造。

由于天然的 β_2 AR在生物体内的含量低且难于分离,为了获取纯度高、活性好的 β_2 AR,近年来人们尝试几乎所有的体外表达系统,均表达出具有一定活性的受体蛋白。本次实验在大肠杆菌成功表达的 β_2 AR受体蛋白虽比以往其他系统表达的蛋白活性低,但比较其他大肠杆菌表达系统的研究^[3],本实验得到了活性较高的受体蛋白。并且利用分子对接技术实现对 β_2 AR基因的改造,为 β_2 AR基因的人工改造提供新的思路,为实现 β 受体激动剂的快速检测奠定了理论基础。

4 结论

本实验利用分子对接技术对 β_2 AR基因进行改造,利用大肠杆菌表达系统成功表达出具有活性的 β_2 AR受体蛋白,ELISA进行其活性鉴定结果显示, β_2 AR受体蛋白与克伦特罗、莱克多巴胺及非诺特罗均能够特异性结合,OD值分别为0.45、0.32、0.36,与分子对接结果基本一致。多残留检测曲线显示,该 β_2 AR受体蛋白具有一定的检测 β 受体激动剂的能力,这为 β_2 肾上腺素受体在 β 受体激动剂的快速检测方面提供新的思路。

参考文献

- [1] 王健. β 激动剂直接竞争酶重组受体分析技术研究[D].北京:中国农业科学院,2015
WANG Jian. Direct competitive enzyme-linked recombinant receptor analysis for detection of β adrenergic agonists [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015
- [2] 王健,刘媛,王静.猪 β_2 肾上腺素受体的表达、纯化及鉴定[J].现代食品科技,2016,6:24-28
WANG Jian, LIU Yuan, WANG Jing. Expression,

purification, and identification of β_2 adrenergic receptors in pigs [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 6: 24-28

- [3] 王迪. β_2 受体的表达、纯化及在快速检测中的应用[D].北京:中国农业科学院,2008
WANG Di. Expression and purification of β_2 adrenergic receptor and its application in rapid detection technology [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008
- [4] Gerasimov A S, Zeinalov O A, El Darov M A, et al. Biosynthesis of human β_2 -adrenergic receptor in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification [J]. Molecular Biology, 2012, 46(2): 279-286
- [5] Cheng G, Li F, Peng D, et al. Development of an enzyme-linked-receptor assay based on Syrian hamster β_2 -adrenergic receptor for detection of β -agonists [J]. Analytical Biochemistry, 2014, 459: 18
- [6] Prashen Chelikani P J R U. The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line [J]. Protein Science, 2006, 15(6): 1433-1440
- [7] Joedicke L, Trenker R, Langer J D, et al. Cell-free synthesis of isotopically labelled peptide ligands for the functional characterization of G protein-coupled receptors [J]. Febs Open Bio., 2016, 6(1): 90-102
- [8] Shoichet B K, Kuntz I D, Bodian D L. Molecular docking using shape descriptors [J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 13(3): 380-397
- [9] 杨德秋,杨潇.基于分子对接技术的农药敏感乙酰胆碱酯酶的虚拟筛选[J].现代农药,2015,2:14-18
YANG De-qiu, YANG Xiao. Virtual screening of acetylcholinesterase sensitive to pesticides based on molecular docking [J]. Modern Agrochemicals, 2015, 2: 14-18
- [10] Tang H, Wang X S, Hsieh J H, et al. Do crystal structures obviate the need for theoretical models of GPCRs for structure-based virtual screening? [J]. Proteins-structure Function & Bioinformatics, 2012, 80(6): 1503
- [11] 冀树伸,黄新安,罗荣华,等.分子对接技术筛选抗 HIV-1 逆转录酶活性化合物[J].广州中医药大学学报,2015,4(4):725-728
JI Shu-shen, HUANG Xin-an, LUO Rong-hua, et al. Screening of active compounds against HIV-1 reverse transcriptase based on molecular docking [J]. Journal Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2015, 4(4): 725-728

- [12] 任洁,魏静.分子对接技术在中药研究中的应用[J].中国中医药信息杂志,2014, 21(1):123-125
REN Jie, WEI Jing. Application of molecular docking technology in traditional Chinese medicine research [J]. Chinese Journal of Information on TCM, 2014, 21(1): 123-125
- [13] 刘欣,胡燕,崔一然,等.基于分子对接技术的辛热药药性表达研究[J].中华中医药杂志,2013,5:1281-1286
LIU Xin, HU Yan, CUI Yi-ran, et al. Xin hot medicine medicinal expression based on the technology of molecular docking [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 5: 1281-1286
- [14] Xiujuan W, Feng Z, Fei D, et al. Simultaneous determination of 12 β -agonists in feeds by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1278: 82-88
- [15] Du W, Zhao G, Fu Q, et al. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples [J]. Food Chemistry, 2014, 145(145C): 789
- [16] Zhang M X, Li C, Wu Y L. Determination of phenylethanolamine A in animal hair, tissues and feeds by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with QuEChERS [J]. Journal of Chromatography B, 2012, 900: 94-99
- [17] Gao H, Han J, Yang S, et al. Highly sensitive multianalyte immunochromatographic test strip for rapid chemiluminescent detection of ractopamine and salbutamol [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 839: 91-96
- [18] Li Y, Lu S, Liu Z, et al. A monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of phenylethanolamine A in tissue of swine [J]. Food Chemistry, 2015, 167: 40-44
- [19] Zhang J, Wang Z, Wen K, et al. Penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* and its application in screening of β -lactams in milk [J]. Analytical Biochemistry, 2013, 442 (2): 158-165
- [20] Zhang X, Zhao H, Xue Y, et al. Colorimetric sensing of clenbuterol using gold nanoparticles in the presence of melamine [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2012, 34(1): 112-117
- [21] 王培龙. β -受体激动剂及其检测技术研究[J].农产品质量与安全,2014,1:44-52
WANG Pei-long. β adrenergic agonists and its testing technology [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2014, 1: 44-52
- [22] 熊琳,李维红,高雅琴,等.肉品中 β -受体激动剂类药物残留检测技术研究进展[J].食品安全质量检测学报,2015,2:528-533
XIONG Lin, LI Wei-hong, GAO Ya-qin, et al. A review of inspection technology of β -agonist drug residues in meat [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 2: 528-533
- [23] 周月,张冰,林志健,等.基于分子对接技术虚拟筛选菊苣与肠道CNT2结合的化学成分研究[J].中国中药杂志,2016,41(21):3962-3967
ZHOU Yue, ZHANG Bing, LIN Zhi-jian, et al. Virtual screening for components in Chicory combined with CNT2 target based on molecular docking [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(21): 3962-3967
- [24] 陶国翔,李爱秀,封加栋,等.基于分子对接技术研究漆酶与介质间的结合模式与相互作用机制[J].化学与生物工程,2016,33(12):42-47
TAO Guo-xiang, LI Ai-xiu, FENG Jia-dong, et al. Binding mode and interaction mechanism of laccase and mediator based on molecular docking technology [J]. Chemistry & Bioengineering, 2016, 33(12): 42-47
- [25] 陈晋莹,桑梓苔.利用计算机模拟分子对接技术探究粮食中黄曲霉毒素的毒理效应[J].粮食储藏,2016,45(3):33-38
CHEN Jin-ying, SANG Zi-tai. Exploration of toxicity mechanism in aflatoxin and its metabolic products using computer-aid molecular docking technology [J]. Grain Storage, 2016, 45(3): 33-38
- [26] 白启峰.G 蛋白偶联受体与小分子配体相互作用机制的分子模拟研究[D].兰州:兰州大学,2014
BAI Qi-feng. Studies on interaction mechanism between G-protein coupled receptors and their ligands using molecular simulations [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2014