

胭脂红酸人工抗原合成及多克隆抗体的制备

何峰容^{1,2}, 杨帆帆², 李佳楠¹

(1. 江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056) (2. 武汉云克隆科技股份有限公司, 湖北武汉 430056)

摘要: 为了快速高效检测食品中胭脂红酸含量, 本研究通过羧基二咪唑法制备了胭脂红酸人工抗原; 通过免疫新西兰大白兔获得了胭脂红酸抗血清, 经硫酸铵沉淀法分离纯化获得抗胭脂红酸多克隆抗体; 利用棋盘滴定法检测了抗体效价, 并探究了溶液 pH 值、离子强度和有机溶剂对 ELISA 反应的影响, 优化出最佳 ELISA 反应条件; 在最佳反应条件下, 建立了胭脂红酸的间接竞争 ELISA 抑制曲线。紫外光谱扫描结果显示, 免疫抗原 (CA-BSA) 和检测抗原 (CA-OVA) 均与载体蛋白成功偶联; 经分离纯化获得的胭脂红酸多克隆抗体效价为 1:16000; 检测抗原最佳浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、ELISA 反应最适缓冲液为 pH 7.4、含 50 mmol/L Na^+ 且无甲醇的磷酸盐缓冲液; 间接竞争 ELISA 标准曲线的线性范围为 7.8~1150 ng/mL, 检测限为 1 ng/mL, 灵敏度 IC_{50} 值为 95.2 ng/mL。本研究为开发 CA 快速检测试剂盒对食品中胭脂红酸含量的大量快速测定奠定了基础。

关键词: 胭脂红酸; 人工抗原; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

文章编号: 1673-9078(2019)03-270-274

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.3.040

Synthesis of Carminic Acid Artificial Antigen and Preparation Its Polyclonal Antibodies

HE Feng-rong^{1,2}, YANG Fan-fan², LI Jia-nan¹

(1. Life Science College, Jiangnan University, Wuhan 430056, China)

(2. Wuhan Cloud-Clone Co. Ltd., Wuhan 430056, China)

Abstract: In order to detect rapidly and efficiently the content of carminic acid (CA) in food, the artificial antigen of CA was prepared by hydroxydiimidazole method; A high-titer polyclonal antibody (Pab) against CA was obtained through immunizing New Zealand white rabbits to obtain antiserum (against CA) for further separation and purification by ammonium sulfate precipitation. The titer of the antibody was tested by checkerboard titration, and the effects of factors such as solution pH, ionic strength, and organic solvent were investigated to optimize the conditions of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reaction. Under the optimal conditions, an indirect competitive ELISA inhibition curve for CA was established. Ultraviolet (UV) spectroscopy analysis showed that both the immunogenic antigen (CA-BSA) and coating antigen (CA-OVA) were successfully conjugated with carrier protein. The titer of the Anti-CA polyclonal antibody obtained after separation and purification was 1:16000; The optimal concentration of the detection antigen was 1 $\mu\text{g/mL}$, the optimum buffer for ELISA reaction was the phosphate buffer at pH 7.4 containing 50 mmol/L Na^+ but no methanol. The linear range of the indirect competitive ELISA standard curve was 7.8~1150 ng/mL, with the limit of detection (LOD) as 1 ng/mL, and the sensitivity IC_{50} was 95.2 ng/mL. This study has laid the foundation for the development of a rapid CA rapid test kit for the determination of CA in food.

Key words: carminic acid; artificial antigen; polyclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

胭脂红酸是从雌性胭脂虫体内提取的一种蒽醌类天然色素胭脂红的主要成分, 其理化性质非常稳定。胭脂红酸是目前我国使用最广泛、用量最大的一种单偶氮类人工合成色素, 常用作酒、水果浆、冷饮等饮料、糖果、糕点以及肉类、香肠等的着色剂^[1]。然而, 偶氮化合物在体内可代谢生成致突变原前体-

收稿日期: 2018-09-28

基金项目: 武汉市黄鹤英才计划 (2014)

作者简介: 何峰容 (1975-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 免疫学

通讯作者: 李佳楠 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

芳香胺类化合物, 因此, 美国、加拿大和挪威禁止在食品中添加胭脂红酸; 中国、欧盟和日本等国对其使用范围和最高使用量也都有严格规定。我国颁布的有关食品添加剂使用标准 (GB 2760-2014) 中规定^[2], 胭脂红酸在食品中的添加剂量范围为 0.025~0.5 g/kg。目前, 胭脂红酸的检测方法主要有分光光度法^[3]和高效液相色谱法 (HPLC)、液相质谱法 (LC-MS 或 LC-MS/MS)、气相质谱法 (GC-MS)^[4]。这些方法均需要对样品中的胭脂红酸进行分离才能定量分析, 且色谱技术需昂贵的仪器设备, 和专业分析人员操作,

且不能大量快速测定,不利于相关部门的监督管理。因此,建立快速有效的方法检测食品中胭脂红酸含量对于方便监管部门监督管理,从而保护消费者健康具有重要意义。

免疫分析技术作为一种快速、高灵敏度、高特异性的检测方法,正广泛应用于有毒、有害药物的残留检测。免疫分析法是以抗原抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的分析方法,具有专一性高、特异性强、价格低廉等特点,能够满足大量快速检测的需要。免疫测定法中酶联免疫吸附试验(ELISA)法操作简便、廉价、快速、通量高,又能进行定量测定,在抗生素、雌激素、农药残留检测领域有着广泛的应用,张正挺等^[5]人工合成了青霉素抗原,制备了抗青霉素单克隆抗体及检测试剂盒,利用酶联免疫检测技术测定了牛奶中残留青霉素含量;张岩蔚等^[6],合成了氨苄西林人工抗原,免疫小鼠,获得了多克隆抗体,测定了抗体效价,并且建立了间接竞争 ELISA 抑制曲线;杨凡凡^[7]合成了雌二醇人工抗原,获得了鼠源性多克隆抗体,并利用抗体检测了样品中雌二醇的含量。目前,在食品添加剂的检测方面,利用免疫分析技术的报道并不多,尤其是色素检测方面未见报道。

本研究将胭脂红酸(CA)分别与大分子蛋白牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)通过羰基二咪唑法偶联制备免疫抗原和检测抗原,用免疫抗原免疫新西兰大耳白兔,获得抗 CA 血清,经分离纯化获得多克隆抗体,采用间接竞争 ELISA 法筛选出效价高、特异性强的抗体,为建立食品中胭脂红酸的免疫学检测方法和开发快速检测试剂盒奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

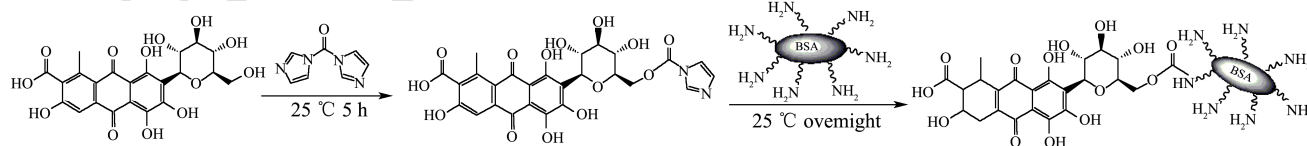


图1 免疫抗原的合成

Fig.1 The synthetic approach to immunogen production

1.2.2 人工抗原鉴定

采用紫外光谱扫描法对合成的人工抗原进行鉴定。用浓度为 0.01 mol/L, pH 值 7.4 的 PBS 将 BSA、CA、CA-BSA、CA-OVA 配制成 0.5 mg/mL 的溶液,用 PBS 进行基线调零,在 200~600 nm 范围内对上述溶液进行紫外光谱扫描,记录不同波长下的吸光值,分析数据并将紫外光谱进行组合,利用组合图分析

1.1.1 主要试剂

卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)购自北京政博伟业生物科技有限公司;N,N'-羰基二咪唑(CDI)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 为云克隆科技股份有限公司生产;其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

酶标仪(波长范围 450 nm~630 nm)由云克隆科技股份有限公司制造;紫外分光光度计 UV2600,日本岛津公司;高速离心机 KDC140-HR,安徽中科中佳科学仪器有限公司;96 孔酶标板,美国康宁公司。

1.1.3 主要缓冲液

磷酸盐缓冲液(PBS): 0.01 mol/L pH 7.4;洗涤缓冲液(PBS-T): 含 0.05% Tween-20 的 PBS;终止液: 2 M H₂SO₄;封闭液: 100 mL PBS 中加入 1 g OVA。

1.1.4 实验动物

健康雄性新西兰大耳白兔 2 只,月龄 3 个月,体重 2~2.5 kg,由云克隆动物研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 人工抗原合成^[8]

人工抗原合成采用羰基二咪唑法,免疫抗原(CA-BSA)的制备方法为:将 9 mg CA 和 11.5 mg CDI 混合并溶解于 1 mL 二甲亚砜(DMSO)中,于 25 °C 避光搅拌 5 h,而后逐滴加入 2 mL 浓度为 10 mg/mL 的 BSA 溶液中,室温反应过夜(约 12 h),然后用 PBS 缓冲液透析人工合成抗原两天,期间换液 4 次;用同样的方法制备检测抗原(CA-OVA)。将透析后的免疫抗原(CA-BSA)和检测抗原(CA-OVA)经真空冷冻干燥后,于 -20 °C 冷冻保存备用。免疫抗原合成路线见图 1。

CA 是否与 BSA、OVA 偶联。

1.2.3 多克隆抗体的制备

首次免疫,取 1 mg 免疫抗原 CA-BSA 用生理盐水配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液,与等体积的弗氏完全佐剂混匀,并充分乳化,于新西兰大耳白兔背部皮下多点注射,免疫抗原用量为每次 0.5 mg/只;四周后进行加强免疫,取 1 mg 免疫抗原 CA-BSA 用生理盐

水配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液,与等体积的弗氏不完全佐剂混匀,并充分乳化,于新西兰大耳白兔背部皮下多点注射,免疫抗原用量为每次 0.5 mg/只;加强免疫间隔为四周,分别于第二、三次加强免疫后 7 d 在兔耳缘静脉处采血 200 μ L,分离血清后用间接 ELISA 法检测血清中抗体效价。在最后一次免疫 7~10 d 后股动脉采兔全血,10000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心处理后收集全部血清,储存于-20 $^{\circ}$ C 条件下备用。

1.2.4 多克隆抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化多克隆抗体。取 1 mL 抗血清,加入 2 mL 浓度为 0.06 mol/L、pH 值为 4.5 的醋酸钠缓冲液;缓慢逐滴加入 50 μ L 正辛酸至上述溶液中,室温搅拌 30 min,4 $^{\circ}$ C 下静置 2 h 后 10000 r/min 离心 30 min,去沉淀;取上清液用定性滤纸过滤,并加入 1/10 体积稀释 10 倍后的 PBS 溶液,随后用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.4,4 $^{\circ}$ C 下加硫酸铵 0.277 g/mL,使溶液最终饱和度为 45%,4 $^{\circ}$ C 搅拌 30 min,静置 2 h,4 $^{\circ}$ C 下 10000 r/min 离心 10 min,弃上清;将沉淀用少量 PBS 溶液溶解,并在 4 $^{\circ}$ C 下使用 pH 7.4、浓度 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液透析过夜。透析后获得的纯化多克隆抗体用离心管分装,-20 $^{\circ}$ C 下贮藏备用。

1.2.5 多克隆抗体效价检测

多克隆抗体效价检测采用间接竞争 ELISA 法测定。将包被抗原用包被液稀释至浓度为 10 μ g/mL,加入酶标板中,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;弃去孔中液体,加入 300 μ L PBST 洗涤缓冲液洗涤,5 min 后弃去洗涤液,重复 3 次;加入用包被液稀释的浓度为 1% 的 OVA 溶液,37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, PBST 洗涤液洗涤 3 次;每孔加入 50 μ L CA 标准品,浓度为 100 ng/mL,同时加入 50 μ L 用 PBS 缓冲液倍比稀释 (1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000、1:32000) 的多克隆抗体稀释液,37 $^{\circ}$ C 下反应 1 h,然后用 PBST 洗涤液洗涤 4 次;每孔加入 100 μ L 按 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (IgG-HRP),37 $^{\circ}$ C 反应 40 min, PBST 洗涤液洗涤 5 次;每孔加入 100 μ L TMB,约 8 min 后,每孔加入 50 μ L 终止液终止反应;于 450~630 nm 波长下,用酶标仪读取各孔吸光值。

根据棋盘滴定法以 450 nm 波长下的吸光值在 1.0 左右的稀释浓度作为抗 CA 多克隆抗体的工作浓度,将 CA 标准品配制成浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 μ g/mL 的系列标准品溶液,分析抗原(CA-OVA)和抗体最佳反应浓度,同时研究了 pH 值 5.4~9.4, Na^+ 离子浓度 20~500 mmol/L,以及浓度为 0%~30% 的甲醇溶液中

ELISA 反应的敏感性,以选择最优的间接竞争 ELISA 反应条件。

1.2.6 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立^[9]

在优化的间接竞争 ELISA 反应条件下,以 B/B₀ 值 (B 是不同浓度 CA 标准品 450 nm 处的吸光值; B₀ 是不加标准品时 450 nm 处的吸光值) 为纵坐标, CA 标准品浓度 (0.5、1、2、5、10、25、50、100、250、500、1000、4000 ng/mL) 为横坐标,绘制间接竞争 ELISA(ic-ELISA)标准曲线,进行相关性分析。灵敏度用 IC₅₀ 值表示,代表标准品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度;线性范围表示最大信号值 20%~80% 的抑制率(IC₂₀~IC₈₀);检测限以 IC₁₀ 值计算。

1.2.7 数据统计分析

每个检测样品做三次重复,数据采用 Excel 软件进行分析,实验结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。

2 结果

2.1 人工抗原的紫外扫描鉴定

人工抗原利用紫外光谱法进行鉴定^[10]。在 200~600 nm 范围内紫外光谱扫描 BSA、CA、CA-BSA、CA-OVA 溶液。结果如图 2 所示,其中半抗原 CA 与载体蛋白 BSA 的紫外图谱作为对照。从图 2 中可以看出,BSA 在 280 nm 处有强特征吸收,CA 在 510 nm 处有特征吸收,CA-BSA 在 515 nm 附近出现宽的吸收峰,相对于 CA 半抗原吸收峰有所蓝移,说明半抗原 CA 和载体蛋白 BSA 偶联成功。CA-OVA 在 520 nm 处有一宽吸收峰,且相对于 CA 半抗原吸收峰也有所蓝移同时,说明检测抗原 CA-OVA 也成功合成。

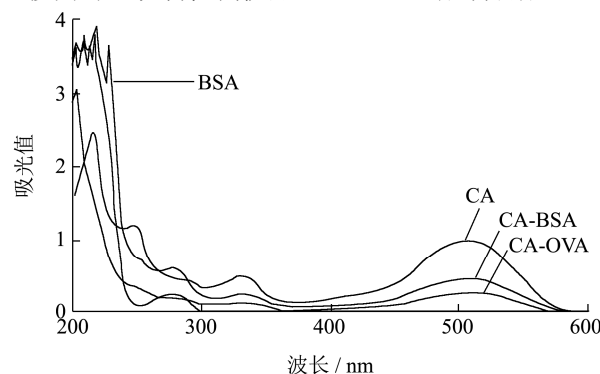


图 2 BSA、CA、CA-OVA 和 CA-BSA 的紫外可见吸收光谱
Fig.2 The UV-vis absorption spectra of BSA, CA, CA-OVA and CA-BSA, respectively

2.2 多克隆抗体效价测定结果

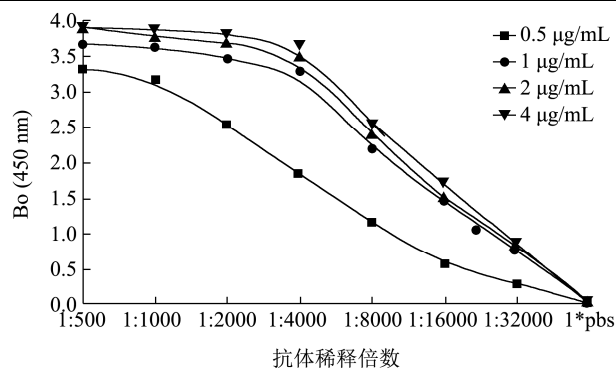


图3 ELISA 的棋盘免疫滴定

Fig.3 Checkerboard titration of ELISA

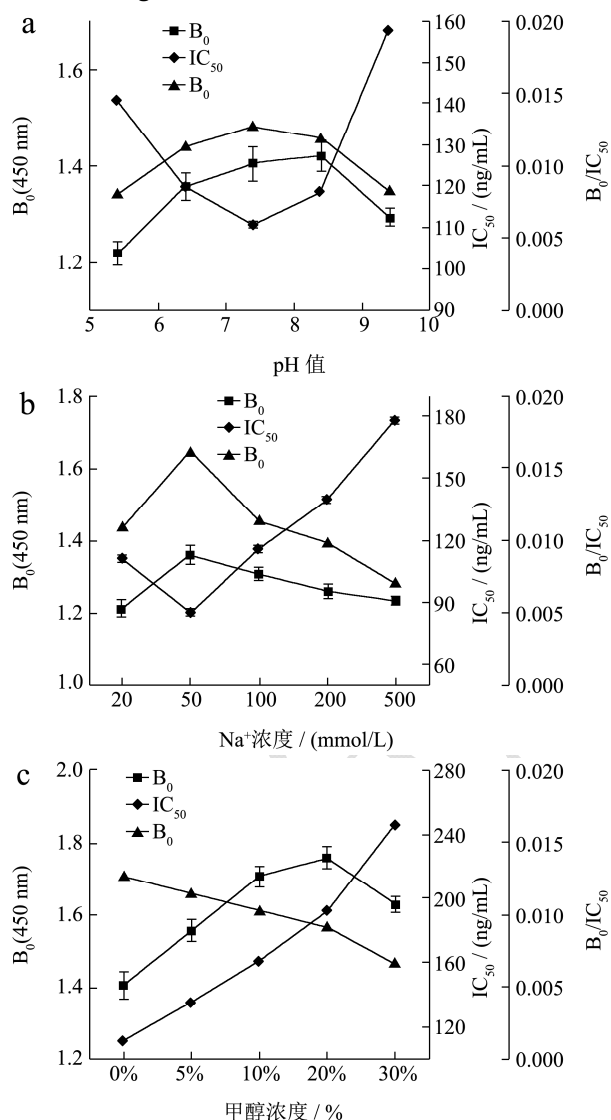


图4 pH 值、离子强度和有机溶剂对 ELISA 敏感性的影响

Fig.4 Effects of pH value, organic solvent, and ionic strength on ELISA sensitivity (n=3)

依次用浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 的检测抗原 (CA-OVA) 包被酶标板, 间接竞争 ELISA 法检测纯化的抗体效价, 选取吸光值 1.0 时对应的最高稀释倍数为该抗体的检测效价。棋盘滴定

检测结果如图 3 所示, 当检测抗原浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抗 CA 的多克隆抗体效价为 1:8000, 而检测抗原浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抗 CA 多克隆抗体效价可达 1:16000 以上, 因此, 间接竞争 ELISA 反应的检测抗原 CA-OVA 最佳反应浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 证明 CA 多克隆抗体制备成功, 也进一步证明 CA 与载体蛋白 BSA、OVA 偶联成功。

同时, 在检测抗原浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 条件下, 分析了 pH 值 5.4、6.4、7.4、8.4、9.4, Na^+ 离子浓度 20 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、500 mmol/L 以及甲醇浓度 0%、5%、10%、20%、30% PBS 溶液中间接竞争 ELISA 反应的敏感性。IC₅₀ 表示标准品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度, B₀/IC₅₀ 值是评价不同因素对间接竞争 ELISA 反应灵敏度的重要参数^[11]。图 4a 显示, pH 值在 5.4~9.4 范围内上升时, B₀/IC₅₀ 值先上升后下降, 当 pH 值为 7.4 时, B₀/IC₅₀ 值最大; 图 4b 显示, Na^+ 浓度为 50 mmol/L 时, B₀/IC₅₀ 值最大, 随着 Na^+ 浓度的上升, B₀/IC₅₀ 值显著下降, 说明较高的 Na^+ 浓度会严重影响 ELISA 反应的敏感性; 图 4c 显示, 有机溶剂甲醇对 ELISA 反应的敏感性影响显著, 甚至可抑制抗 CA 抗体和检测抗原 CA-OVA 的结合。综上所述, 在 pH 7.4、 Na^+ 浓度为 50 mmol/L, 无有机溶剂的 PBS 缓冲液中, ELISA 具有最高的灵敏度, 适合在该反应条件下进行间接竞争 ELISA 标准曲线的建立和样品检测。

2.3 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

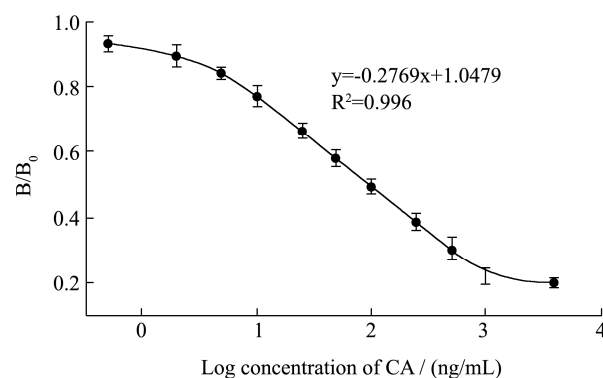


图5 CA 的竞争抑制曲线

Fig.5 The competitive inhibition curve for CA (n=3)

根据棋盘滴定法的结果, 用浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA-OVA 包被酶标板, CA 多克隆抗体 1:16000 稀释上样, 优化的间接竞争 ELISA 标准曲线如图 5 所示。结果显示, 间接竞争 ELISA 抑制曲线线性良好, 回归方程式为 $y = -0.2769x + 1.0479$ ($R^2 = 0.996$), IC₅₀ 值为 95.2 ng/mL, 经计算得出标准曲线在 PBS 中的线性检测范围为 7.8~1150 ng/mL, 检测限为 1 ng/mL, 说明制备

的多克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强,可进一步制备胭脂红酸快速检测试剂盒。

3 结论

3.1 抗原是能刺激机体免疫系统产生特异性免疫应答,并能在体内发生特异性反应的物质。同时具有免疫原性和抗原性的物质称为完全抗原。胭脂红酸(CA)属于小分子物质,具有抗原性但不具有免疫原性,只有与大分子蛋白偶联才能刺激机体产生抗体。自Landsteine首次利用半抗原制备人工抗原以来,人们对农药、兽药和饲料添加剂等很多领域的半抗原物质进行了大量的免疫学研究。

3.2 与半抗原偶联的载体表面应具有化学活性基团,并具备一定的容量,可以偶联足够的分子,且载体应该是惰性的,不应干扰偶联分子的功能,并具有足够的稳定性。目前合成人工抗原常用的载体蛋白有牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、匙孔血蓝蛋白(KLH)、兔血清白蛋白(RSA)、人血清白蛋白(HAS)以及多聚赖氨酸等。本研究选择了牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清蛋白(OVA)分别作为免疫抗原和检测抗原的载体。

3.3 目前合成人工抗原主要有静电偶联和共价偶联两种方法,其中共价偶联法效果较好,包括混合酞酐法、碳二亚胺法、羰基二咪唑法、氨基氧乙酸法、丁二酸酐衍生法等^[12]。本研究采用的是羰基二咪唑法,因为N,N'-羰基二咪唑是引入羰基的高活性试剂,在肽合成中可形成极好的酰胺键。含羟基的分子同羰基二咪唑反应,形成中间体咪唑基甲酸酯,能和N-亲核试剂反应,得到N-烷基化的甲酸酯键,通常蛋白质通过N-端(α -氨基)和赖氨酸侧链的(ϵ -氨基)和分子形成不带电的类似尿烷的衍生物,具有极好的化学稳定性。

3.4 本研究选用牛血清白蛋白BSA和卵清蛋白OVA作为载体蛋白,采用羰基二咪唑法合成了免疫抗原CA-BSA和检测抗原CA-OVA,结果显示人工合成的抗原具有极好的化学稳定性。用此抗原免疫新西兰大白兔后制备出效价高、反应灵敏、特异性强的抗CA的多克隆抗体,并建立了CA的间接竞争ELISA标准曲线,为开发CA快速检测试剂盒对食品中胭脂红酸含量的大量快速测定奠定了基础。

参考文献

- [1] 李晓莹.充气糖果中胭脂红酸的高效液相色谱测定[J].黑龙江医药,2018,31(3):476-478
LI Xiao-ying. High performance liquid chromatographic

determination of carmine in inflatable candy [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2018, 31(3): 476-478

- [2] GB 2760,食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]
GB 2760, National Standard for Food Safety Standard for Use of Food Additives [S]
[3] 高敏,和玲,胡敏,等.胭脂红酸老化的紫外光谱法研究[J].湖南大学学报(自然科学版),2013,40(4):83-86
GAO Min, HE Ling, HU Min, et al. Study on the aging of carminic acid by UV-vis spectrophotometry [J]. Journal of Hunan University (Natural Sciences), 2013, 40(4): 83-86
[4] 郭蒙京,李堃,赵丹莹.食品中胭脂虫红的高效液相色谱测定法[J].职业与健康,2016,32(18):2508-2510
GUO Meng-jing, LI Kun, ZHAO Dan-ying. Determination of carminic acid in food by HPLC [J]. Occupation and Health, 2016, 32(18): 2508-2510
[5] 张正挺.酶联免疫检测技术测定牛奶中青霉素含量和试剂盒研制[D].杭州:浙江大学,2014
ZHANG Zheng-ting. Determination of penicillin content in milk by ELISA and preparation of ELISA kits [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014
[6] 张岩蔚,金艳丹,栗慧,等.氨基西林人工抗原的合成及鼠源多克隆抗体的制备[J].黑龙江畜牧兽医,2018,1:227-229
ZHANG Yan-wei, JIN Yan-dan, SU Hui, et al. Synthesis of ampicillin artificial antigen and preparation mouse polyclonal antibodies [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018, 1: 227-229
[7] 杨凡凡.雌二醇人工抗原合成及其多克隆抗体的制备[J].江西畜牧兽医杂志,2017,3:4-7
YANG Fan-fan. Synthesis of estradiol artificial antigen and preparation of its polyclonal antibodies [J]. Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 3: 4-7
[8] Xing W. Development of a sensitive and group-specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of malachite green and leucomalachite green in water and fish samples [J]. Sic. Food Agric., 2009, 89: 2165-2173
[9] Yang F, Zhu L, Meng W, et al. Novel artificial antigen synthesis for antibody production and development of an indirect competitive ELISA of cyanocobalamin [J]. Anal Methods, 2015, 7:5275-5281
[10] Ruwona T B, Johnson V J, Hettick J M, et al. Production, characterization and utility of a panel of monoclonal antibodies for the detection of toluene diisocyanate haptenated proteins [J]. Journal of Immunological Methods, 2011, 373(2): 127-135

(下转第240页)

现代食品科技