

氯丙嗪抗体制备与酶联免疫吸附测定方法的建立

袁利鹏, 刘波, 尹凯丹

(广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广东广州 510507)

摘要: 本研究针对动物性食品中违禁药物氯丙嗪残留问题, 建立了针对氯丙嗪的酶联免疫吸附测定方法。首次通过以氯丙嗪为原料, 先去甲基化合成 N-甲基氯丙嗪, 再与丙烯酸叔丁酯反应及水解等步骤成功合成了氯丙嗪半抗原 (CPZ-H)。半抗原 CPZ-H 分别与 OVA 和 BSA 通过活泼酯法偶联合成包被原与免疫原, 采用免疫原 CPZ-H-BSA 免疫新西兰大白兔成功制备了特异性的抗氯丙嗪的多克隆抗体。基于该抗体建立了快速测定氯丙嗪的间接竞争酶联免疫吸附测定方法 (ic-ELISA)。通过优化 ic-ELISA 方法的最佳工作条件, 确定包被原和抗体稀释倍数均为 1:8000 时效果最好, 此时标准曲线的 IC_{50} 为 1.1 ng/mL, 线性范围为: 0.13 ng/mL~8.8 ng/mL。制备的抗氯丙嗪的多克隆抗体与其它氯丙嗪类似物无交叉反应, 特异性好。本研究为今后高特异性氯丙嗪快速检测试剂盒的制备提供依据。

关键词: 氯丙嗪; 半抗原; 酶联免疫吸附分析方法

文章编号: 1673-9078(2019)08-325-330

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.8.045

Preparation of Conjugate Antigen and Antibody to Chlorpromazine in the Animal Food

YUAN Li-peng, LIU Bo, YIN Kai-dan

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Guangdong AIB Polytechnic, Guangzhou 510507, China)

Abstract: In this study, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of chlorpromazine residues in animal foods was established. Chlorpromazine hapten (CPZ-H) was synthesized from chlorpromazine by demethylation, reaction with tert-butyl acrylate and hydrolysis for the first time. Hapten CPZ-H was conjugated with OVA and BSA by active ester method to form the coated antigen and immunogen, respectively. New Zealand white rabbits were immunized with immunogen CPZ-H-BSA to successfully prepare specific polyclonal antibodies against chlorpromazine. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) for the rapid determination of chlorpromazine was established based on the antibody. By optimizing the working conditions of ic-ELISA method, it was determined that the dilution fold of coated antigen and antibody was 1:8000. At this time, the IC_{50} of standard curve was 1.1 ng/mL and the linear range was 0.13 ng/mL~8.8 ng/mL. The prepared polyclonal antibody against chlorpromazine has good specificity and no cross reaction with other chlorpromazine analogues. This study provides a basis for the preparation of specific and rapid detection kit for chlorpromazine in the future.

Keywords: chlorpromazine; hapten; ELISA

吩噻嗪药物 (Phenothiazines, PZs) 在临床上常用治疗人的精神疾病, 其作用机理是作为多巴胺受体阻断剂, 抑制脑内多巴胺神经系统亢进, 从而在保持病人的清醒的情况下, 达到治疗狂躁不安, 精神错乱等症状的目的。其中, 氯丙嗪 (Chlorpromazine, CPZ)

收稿日期: 2019-07-12

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2015A030313793); 国家级星火计划项目 (2015GA780082); 广东省教育厅高职食品加工技术专业领军人才项目; 广东农工商职业技术学院重点课题 (xyzd1606)

作者简介: 袁利鹏 (1979-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向: 食品安全快速检测

通讯作者: 刘波 (1980-), 女, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

是这类精神治疗药总物的代表^[1]。除此之外, 氯丙嗪也常作为兽药应用于兽医临床上, 多用动物镇静, 麻醉, 止吐等^[2]。氯丙嗪在机体内的排泄速度很慢, 在体内残留时间可达数月之久。另外, 在进入机体后, 有 95% 的氯丙嗪与血液中的血浆蛋白结合, 这些结合后的复合物可轻易地通过血脑屏障、胎盘屏障。机体内残留的氯丙嗪会导致机体出现白细胞减少、体位性低血压、肝功能障碍、皮疹、接触性皮炎等过敏反应, 震颤、静坐不能、流涎等迟发性运动障碍等毒副作用^[3,4]。研究和实践表明, 当氯丙嗪被添加到饲料中喂养动物后, 不仅能促进动物的生长, 还能降低动物应激反应, 在动物运输的过程中减少动物的维持需要、

降低失重和死亡率。因此,有些不法商贩们常常在动物运输过程中大剂量地使用氯丙嗪,导致氯丙嗪残存于动物产品中,对消费者的健康构成威胁,带来潜在的食品安全问题。因此,氯丙嗪的残留问题一直为世界各国所重视。早在1997年欧盟就明令禁止在饲料中添加氯丙嗪(EC)NO.17/97。我国农业部在第176号公告明确指出:严禁氯丙嗪在动物饲料和饮水中添加^[5],后来的第235号公告又指出:允许氯丙嗪的治疗作用,但在动物产品中不得检出^[6]。

目前关于氯丙嗪检测方法的研究主要集中在高效液相色谱法^[7-11]和液相色谱质谱联用法^[12,13]。色谱法灵敏度高,但成本较高,携带不便,不适合用于现场大量样品的快速检测。因此亟需便携、高灵敏度的快速检测产品的研发。建立在以抗原、抗体的特异性反应为基本原理的免疫检测方法具有高选择性和灵敏性等特点,在药物残留检测领域得到广泛的应用,代表了药物残留检测的发展方向^[14,15]。因此,建立动物食品中氯丙嗪残留免疫检测方法具有重要意义。目前有关氯丙嗪的免疫检测方法关键点主要在其半抗原的合成上,其合成方法效率低步骤比较长得到的目标物不稳定^[16-19],本文在研究氯丙嗪半抗原分子免疫原性的基础上,在国内外首次发表新半抗原合成路径,可方便高效合成氯丙嗪的半抗原制备抗原,免疫动物制备抗体,为开发氯丙嗪的快速检测方法提供关键技术参考,进一步完善氯丙嗪快速检测技术,以便更加有效的治理氯丙嗪的非法滥用。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

新西兰大白兔,4~6周龄,购自广东省实验动物中心,动物许可证号SCXK(粤)2019-0035,批次时间符合伦理要求。

1.2 试剂与药品

牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA),上海生工生物科技有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC-HCl)、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、氯丙嗪、丙烯酸叔丁酯、氯甲酸苯酯、甲苯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF),阿拉丁试剂公司;羊抗兔IgG-HRP、弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA),美国Sigma公司。

1.3 主要仪器与设备

旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;磁力搅拌器,

巩义市予华仪器厂;液相色谱串联质谱联用仪,美国AB公司;紫外/可见分光光度计,日本岛津公司;酶联免疫检测仪,美国Thermo scientific公司;离心机,美国Thermo scientific公司。

1.4 半抗原的合成

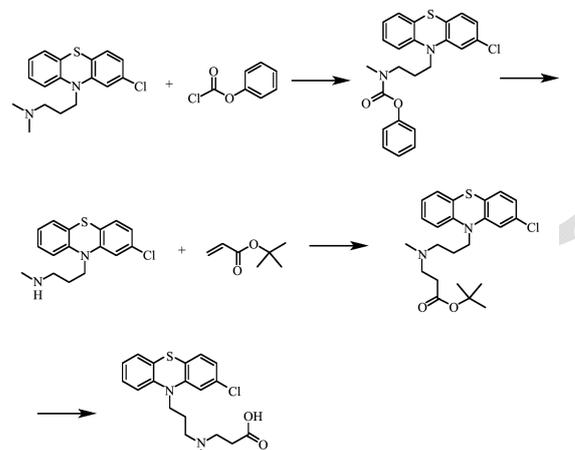


图1 氯丙嗪半抗原的合成路线

Fig.1 The synthesis routing of chlorpromazine haptent.

如图1所示,将5.0 g氯丙嗪溶于30 mL甲苯中,加热至60℃,用恒压滴液漏斗滴加溶有3.26 g氯甲酸苯酯的甲苯混合溶液,滴加完毕后,继续加热至80℃反应2 h,反应过程中用薄层层析(TLC)监测反应进程。待反应完全后,将反应液冷却至室温,依次用5% NaHCO₃水溶液和饱和食盐水洗涤,有机相用无水硫酸钠干燥后过滤,滤液减压浓缩,剩余物经硅胶柱分离纯化得到墨绿色油状物。

将上述获得墨绿色油状物中间体用20 mL的浓盐酸回流水解24 h,然后蒸干水溶液用1N NaOH溶液将残留物pH值调为碱性,乙酸乙酯萃取无水硫酸钠干燥后过滤,滤液减压浓缩,剩余物经硅胶柱分离纯化得脱去苯甲酯的产物,即单N-甲基氯丙嗪。

称取单N-甲基氯丙嗪2.6 g,用30 mL甲醇溶解后加入丙烯酸叔丁酯1.0 g,回流反应5 h,蒸干溶剂,冰浴下加入20 mL CH₂Cl₂和TFA的混合溶液(体积比为2:1),反应2 h后蒸干溶剂,加入50 mL蒸馏水,用乙酸乙酯萃取后有机相减压蒸馏,残留物用硅胶柱纯化得到最终目标物。

1.5 抗原的合成

1.5.1 混合酸酐法制备包被原

称取6.25 mg半抗原溶于1 mL二氧六环中,加入7.1 μL三正丁胺,再加入4 μL氯甲酸异丁酯,室温下搅拌反应30 min,为A液。另取67 mg OVA溶于6 mL 20%的二氧六环中,再滴加60 μL 1 mol/L的NaOH,使

溶液为微碱性, 为B液。将A液缓慢滴入B液中, 用1 mol/L的NaOH调节pH至8.0左右, 4 °C搅拌过夜。反应液装入透析袋用PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 透析, 每12 h换液1次, 共换液6次。透析后离心, 弃沉淀, 上清液分装保存于-20 °C, 即CPZ-H-OVA。

1.5.2 活性酯法制备免疫原

称取3.54 mg半抗原 (0.01 mmol)、1.73 mg NHS (0.015 mmol)、3.09 mg EDC·HCl (0.015 mmol), 全部溶于0.2 mL无水DMF中, 室温下搅拌反应18 h, 将反应液离心 (5000 r/min, 10 min), 弃沉淀, 上清液为活性酯。称取22.5 mg BSA溶于2.25 mL的碳酸盐缓冲溶液 (0.05 mol/L, pH 9.6) 中, 4 °C搅拌下缓慢逐滴加入0.1 mL活性酯, 约30 min加完, 然后继续搅拌4 h, 反应液装入透析袋用PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 透析, 透析72 h, 换6次液, 透析后离心, 弃沉淀, 上清液分装, -20 °C保存, 即CPZ-H-BSA。

1.6 抗体的制备

选取体重在3 kg以上的雌性新西兰大白兔6只, 进行免疫试验。免疫前采血作为阴性血清。按常规用0.5 mg抗原CPZ-H-BSA与2 mL生理盐水和2 mL CFA混合后进行皮下多点注射。15 d后进行第2次免疫剂量与方法同第1次, CFA换成IFA, 8 d后采血测效价。此后每隔15 d进行一次免疫, 方法与用量同第2次免疫。至效价不再上升时, 用免疫原2 mg加2 mL生理盐水和2 mL CFA混合, 耳缘静脉注射。8 d后进行心脏采血, 高速离心后取上清液, -20 °C贮存备用。

1.7 ic-ELISA 操作步骤

用包被液将 His-H-OVA 稀释一定浓度, 加到酶标板孔中, 100 μL/孔, 4 °C冰箱过夜。用洗液洗涤2次, 甩干, 每孔加入封闭液120 μL, 37 °C温箱中孵育3 h。甩干孔中液体, 置37 °C烘箱中3 h烘干备用; 抗体稀释适当倍数, 每孔分别加入不同浓度的N-酰基组胺标准液和抗体各25 μL, 轻摇混合, 37 °C温箱中孵育40 min。洗液洗涤6次, 甩干, 加入1:5000倍稀释的酶标记羊抗兔, 37 °C温箱中孵育30 min, 洗液洗涤6次, 甩干, 加显色液, 37 °C温箱中孵育10 min, 加入50 μL/孔的终止液, 测A_{450 nm}值。

1.8 ic-ELISA条件优化

1.8.1 包被抗原最佳包被浓度和单抗稀释度的选择

将包被抗原CPZ-H-OVA以包被缓冲液做一系列梯度稀释1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、

1:16000、1:32000, 将单抗以血清稀释液做1:1000、1:2000、1:4000、1:8000稀释, 用间接ELISA 进行测定, 确定包被抗原及单抗最佳工作浓度。

1.8.2 包被抗原的包被条件及封闭条件的选择

将包被抗原按照1.7.1所确定的稀释度进行稀释, 分别在以下三种不同的条件下包被酶标板: (1) 4 °C包被过夜; (2) 37 °C包被3 h; 做ELISA试验, 根据OD_{450 nm}值确定最佳包被程序。在确定了包被条件以后, 分别以1% BSA、1%的明胶和1%奶粉三组封闭条件封闭酶标板, 做ELISA试验, 确定最佳封闭液。

1.8.3 竞争性ELISA标准曲线的建立

用以上步骤所得到的最佳抗原包被浓度, 最佳包被条件, 最佳抗体稀释倍数, 最佳封闭液等条件进行竞争性ELISA试验, 制备标准曲线。选定8个CPZ标准品浓度, 分别为0 ng/mL、0.05 ng/mL、0.15 ng/mL、0.45 ng/mL、1.35 ng/mL、4.05 ng/mL、12.15 ng/mL、36.45 ng/mL。待各参数稳定后绘制出抑制曲线, 由Originlab软件拟合曲线得到半抑制浓度 (IC₅₀) 值和线性范围 (IC₂₀~IC₈₀)。

1.9 抗体的特异性分析

选取效果较好的多克隆抗体进行特异性实验, 以验证其抗体的选择性, 五种化合物被用于交叉反应实验。他们分别是: 异丙嗪、奋乃静、盐酸氟奋乃静、盐酸硫利哒嗪、氯普塞吨, 这五种物质的浓度范围: 0~1000 ng/mL, 氯丙嗪和这五种物质的交叉反应性是以他们的IC₅₀为标准。

交叉反应率 (%) = IC₅₀ (氯丙嗪) / IC₅₀ (类似物) × 100%

2 结果与分析

2.1 半抗原设计合成和鉴定

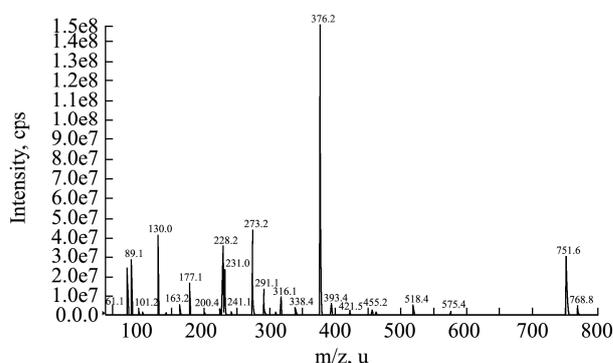


图2 氯丙嗪半抗原质谱图

Fig.2 The MS of CPZ hapten

由图2可见利用质谱法对制备的半抗原进行鉴定

结果 ESI-MS (negative) m/z : 376.2[M-H]。可见反应物中存在 m/z 为 376.2 的质谱峰, 该产物相对分子质量与目标产物的相对分子质量 277.13 一致, 结合反应路线可以确定合成产物即为所需的目标半抗原。同时可见 376.2 的分子离子峰为最强峰, 表明产物为反应体系中的主要物质, 也说明合成的半抗原具备较高的纯度。质谱图结果表明合成成功。

2.2 人工抗原原的鉴定

半抗原与载体蛋白偶联成功与否可通过对比半抗原、载体蛋白和偶联后免疫原的紫外光谱来分辨。如图 3 所示, 载体蛋白 BSA 和 OVA 在 280 nm 波长处有强吸收峰, 偶联产物最大吸收峰向半抗原 283 nm 移动, 人工抗原在 220~283 nm 之间具有半抗原的特征吸收峰, 而且偶联产物的波形比较平缓, 相同浓度下表现出半抗原和载体蛋白的特征吸收, 说明 2 种人工抗原合成成功, 可进行下一步动物免疫。

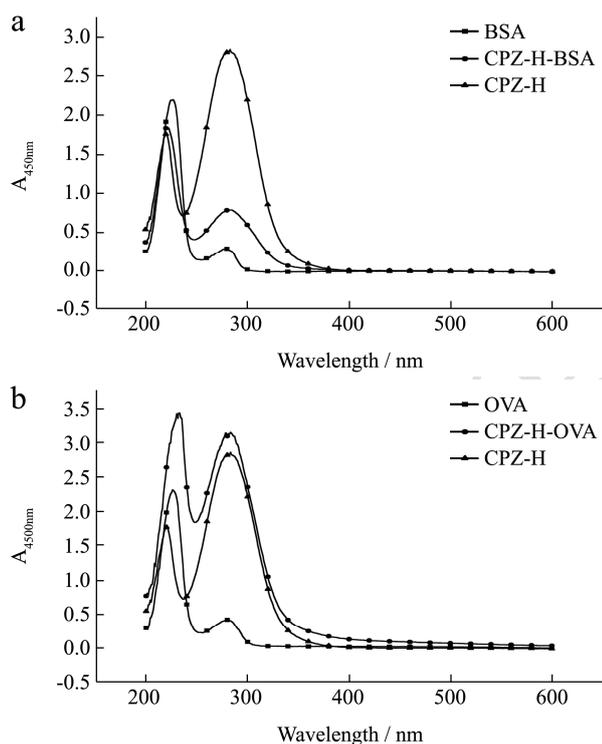


图 3 免疫抗原 (a) 和包被抗原 (b) 紫外吸收曲线

Fig.3 UV spectra of immunogen (a) and coating antigens (b)

2.3 ic-ELISA 检测方法的建立

2.3.1 检测条件的优化

将 ELISA 检测条件进行了优化, 得到的最佳反应条件为: 包被时间 37 °C 作用 3 h, 封闭条件 37 °C 1 h, 封闭液选用 1% BSA。用方阵滴定法确定最适包被抗原稀释倍数为 1:8000, 单抗的最适稀释倍数为 1:8000。

2.3.2 竞争性 ELISA 标准曲线的建立

用上面确定的间接竞争 ELISA 模式建立标准曲线, CPZ 标准品用 PBS 溶解和稀释, 分别测定 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL 标准品的吸光度值 CPZ 浓度的对数值为横坐标, B/B₀ (B 为添加药物时的吸光值, B₀ 为不添加药物时的吸光值) 为纵坐标; 按照 B/B₀-logC 四参数对数拟合绘制 CPZ 标准曲线(图 4), 其中 IC₅₀ 为 1.1 ng/mL 线性范围为: 0.13 ng/mL~8.8 ng/mL (IC₂₀~IC₈₀)。

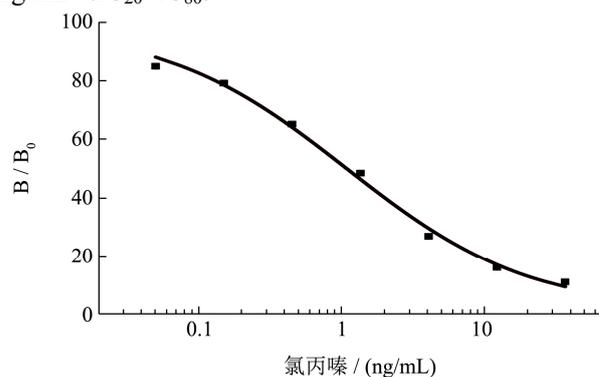


图 4 氯丙嗪的间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig.4 Indirect competitive ELISA curve for CPZ

2.4 抗血清特异性分析

表 1 5 种氯丙嗪类似物 IC₅₀ 与交叉反应率结果

Table 1 IC₅₀ and Cross-reactivity (%) of 5 analogues

名称	结构式	IC ₅₀	交叉反应率/%
氯丙嗪	<chem>CN(C)CCN1c2ccc(Cl)cc2S1</chem>	1.1	100
异丙嗪	<chem>CC(C)CN1c2ccc(Cl)cc2S1</chem>	4.5	24.4%
奋乃静	<chem>CN1CCN(C1)CCN2c3ccc(Cl)cc3S2</chem>	15.2	7.2%
盐酸氟奋乃静	<chem>CC1(C)CCN(C1)CCN2c3ccc(Cl)c(c3)C(F)(F)F</chem>	51.7	2.1%
盐酸硫利哒嗪	<chem>CN(C)CCN1c2ccc(S)cc2S1</chem>	46.3	2.4%
氯普塞吨	<chem>CN(C)CCN1c2ccc(Cl)cc2S1</chem>	3.8	29.0%

进一步对该兔抗血清的特异性进行考察。分别以氯丙嗪及交叉反应物为抑制药物的 ic-ELISA 抑制曲线, 结果如表 1 所示, 得到的抗体与奋乃静、盐酸氟奋乃静、盐酸硫利哒嗪的交叉反应较弱。由于氯丙嗪结构与异丙嗪、氯普塞吨结果相似度很高, 在 5 种与氯丙嗪结构类相似检测过程中, 发现所建立的 icELISA 方法与异丙嗪、氯普塞吨交叉反应较明显, 交叉反应率分别为 24.4%、29%。

3 结论

本研究在分析氯丙嗪分子结构和免疫原性的基础上, 国内外首次设计出一种高效合成氯丙嗪的半抗原的方法, 经过化学修饰合成了: 以氯丙嗪为原料, 通过与氯甲酸苯酯反应脱去一个甲基在经过水解合成 N-甲基氯丙嗪, 再与丙烯酸叔丁酯反应及水解等步骤引入带有直链间隔臂氯丙嗪半抗原; 该合成流程简便、产率较高, 对于含有 N,N-二甲基结构的化合物其半抗原的合成均可以采用此方法。该半抗原经过偶联 BSA 与 OVA 后, 成功地制备了 CPZ-H-BSA 与 CPZ-H-OVA 两种人工抗原。经 CPZ-H-BSA 免疫获得的兔源的多克隆抗体, 经过初步 ELISA 检测其灵敏度可以达到检测要求。经过条件摸索优化后, 本研究成功建立了一种检测 CPZ 的间接竞争 ELISA 方法。与传统的高效液相方法对比, 本方法具有成本较低, 无需昂贵的大型仪器, 操作方便, 特异性好, 灵敏度高的特点。

参考文献

- [1] 马琪林. 氯丙嗪神经药理学研究进展. 国外医学精神病学分册[J]. 1994, 21(1): 16-18
MA Qin-lin. Reviews on neuropharmacology of chlorpromazine. Foreign medical psychiatry volume [J]. 1994, 21(1): 16-18
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学(第二版)[M]. 北京农业出版社, 2001: 77-78
CHEN Zhang-liu. Veterinary Pharmacology (2nd Edition) [M]. Beijing Agricultural Publishing House, 2001: 77-78
- [3] 李婷. 氯丙嗪生态毒理效应与人体健康影响研究与展望. 生态学杂志[J]. 2006, 25(12): 1554-1558
LI Ting. Research and prospect on ecotoxicological effects and human health effects of chlorpromazine [J]. Journal of Ecology. 2006, 25 (12): 1554-1558
- [4] 鲁桂芳, 滕青贤. 氯丙嗪不良反应回顾分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2007, 7(5): 389
LU Gui-fang, TENG Qin-xian. Retrospective analysis of adverse reactions to chlorpromazine [J]. Evaluation and Analysis of Drug use in Chinese Hospitals, 2007, 7(5): 389
- [5] 农业部第 176 号公告. 农业部、卫生部、国家药品监督管理局联合发布《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药品品种目录》, 2002
Announcement No.176 of the Ministry of Agriculture. The Ministry of Agriculture, the Ministry of Health and the State Drug Administration jointly issued the Catalogue of Drug Varieties Prohibited from Use in Feed and Animal Drinking Water, 2002
- [6] 农业部第 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留量, 2002
Announcement No. 235 of the Ministry of Agriculture. Maximum veterinary drug residues in animal food, 2002
- [7] 吴惠勤, 金永春, 等. 气相色谱-质谱法同时检测 10 中常见精神类药物[J]. 分析化学, 2007, 35(4): 500-504
WU Hui-qin, JIN Yong-chun, et al. Simultaneous determination of 10 common psychotropic drugs by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2007, 35(4): 500-504
- [8] 尹明兰. HPLC 法同时监测 5 种抗精神病药血药浓度[J]. 中国药房, 2007, 18(11): 837-838
YIN Ming-lan. Simultaneous monitoring of blood concentration of five antipsychotic drugs by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Pharmacy, 2007, 18(11): 837-838
- [9] 朱砾, 翁毅仁, 林治光, 等. 高效液相色谱法检测氯丙嗪血药浓度[J]. 上海精神医学, 2004, 16(4): 206-208
ZHU Li, WENG Yi-ren, LIN Zhi-guang, et al. Determination of chlorpromazine in blood by high performance liquid chromatography [J]. Shanghai Psychiatry, 2004, 16(4): 206-208
- [10] P Fernández, C González. A rapid ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of seven benzodiazepines in human plasma samples [J]. Anal. Chim. Acta 2013, (767): 88-96
- [11] K Mitrowska, A Posyniak. Rapid method for the determination of tranquillizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Anal. Chim. Acta. 2009(637): 185-192
- [12] A Salomone, E Gerace, P Brizio. A fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine validation and application to real cases of forensic interest [J]. Pharmaceut. Biomed. Anal. 56 (2011) 582-591

- [13] SONG Yi-ping, LI Nan. Dummy template molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of phenothiazines in meat based on computational simulation [J]. Food Chem. 2017, (233)422-428
- [14] 晁博,薛飞群.小分子半抗原抗体制备技术的研究进展[J].中国兽医科学,2006,36(9):757-762
CHAO Bo, XUE Fei-qun. Advances in the preparation of small molecule hapten and antibodies [J]. Chinese Veterinary Science, 2006, 36(9): 757-762
- [15] 李玉珍,林亲录.酶联免疫吸附技术及其在食品安全检测中的应用研究进展[J].中国食品添加剂,2006, (3):108-112
LI Yu-zheng, LIN Qin-lu. Advances in enzyme-linked immunosorbent assay and its application in food safety detection [J]. China Food Additives, 2006, (3):108-112
- [16] SHAN Wen-chong, WANG Jian-ping. Production of the monoclonal antibody against clonazepam for immunoassay of benzodiazepine drugs in swine tissues [J]. Environ Sci Heal, B 2015(50): 15-22
- [17] SHI Fang-shu, WANG Jian-ping. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the determination of phenothiazine drugs in meat and animal feeds [J]. Environ. Sci. Heal. B 2016 (51): 715-721
- [18] SHI Fang-Shu, ZHAGN Lei. Production and evolution of a scfv antibody for immunoassay of residual phenothiazine drugs in meat based on computational simulation [J]. Anal. Meth. 2017 (9): 4455-4463
- [19] WANG Juan, WAGN Yu-lian. Preparation of a generic monoclonal antibody and development of a highly sensitive indirect competitive ELISA for the detection of phenothiazines in animal feed [J]. Food Chem. 2017 (221): 1004-1013
- [20] Hubbard J W, Midha K K. Radioimmunoassay for psychotropic drugs I: Synthesis and properties of haptens for chlorpromazine [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences 1978, 67(11): 1563-1571

(上接第 173 页)

- [13] 熊善柏,赵山,赵思明.脱脂油菜饼粕中蛋白质的分步酶水解研究(II)-蛋白酶的筛选[J].中国粮油学报,2001,16(6):5-8
XIONG Shan-bai, ZHAO Shan, ZHAO Si-ming. Study on step enzymic hydrolysis of protein of defatty rapeseed meal II -selection of protease [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2001, 16(6): 5-8
- [14] In M J, Chae H J, Oh N S. Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin [J]. Bioresource Technology, 2002, 84(1): 63-68
- [15] 谢永洪,刘学文,王文贤,等.鸡肉蛋白酶水解工艺条件的研究[J].农业工程学报,2004,20(5):207-210
XIE Yong-hong, LIU Xue-wen, WANG Wen-xian, et al. Technological conditions for enzymatic hydrolysis of chicken protein [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2004, 20(5): 207-210
- [16] Jamalain A, Sneekes E J, Dekker L J, et al. Dimerization of peptides by calcium ions: investigation of a calcium-binding motif [J]. International journal of proteomics, 2014, 153712
- [17] Huang S L, Zhao L N, Cai X, et al. Purification and characterisation of a glutamic acid-containing peptide with calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate [J]. Journal of Dairy Research, 2015, 82(1): 29-35

(上接第 179 页)

- [28] 徐兆刚,董周永,徐敏,等.响应面优化酶法制备河蚌蛋白抗氧化肽[J].中国食品学报,2017,17(3):120-126
XU Zhao-gang, DONG Zhou-yong, XU Min, et al. Enzymatic preparation of mussel protein antioxidant peptides by response surface optimization [J]. Chinese journal of food science, 2017, 17(3): 120-126
- [29] 李红梅,陈敏.响应面优化绿色产色链霉菌发酵产阿维拉霉素[J].中国食品学报,2017,17(9):108-115
LI Hong-mei, CHEN Min. Production of averamycin by fermentation of response surface optimized green *Streptomyces aureus* [J]. Chinese journal of food science, 2017, 17(9): 108-115
- [30] 洛雪.亚油酸异构酶相关性及其定向进化菌株构建和酶性质的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2015
LUO Xue. Study on the correlation of linoleate isomerase and the construction and enzyme properties of directed evolutionary strains [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2015