

ELISA 法测定鸡肉和虾肉中阿维菌素类药物的残留

程 茹, 吴玉娥*, 陈吉香, 谢体波, 李 平, 何方洋, 张 凯, 吴紫洁, 钟新敏, 袁光宇

(贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵州贵阳 550009)

摘要 [目的] 验证自主研发阿维菌素类药物试剂盒的检测效果。[方法] 采用间接竞争 ELISA 法对鸡肉和虾肉中阿维菌素类药物的残留量进行检测, 并与高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)进行比对。[结果] 以 5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平对空白鸡肉、虾肉样品进行添加回收试验, 平均添加回收率为 92.7%~98.6%, 批内、批间变异系数均小于 10%, 鸡肉、虾肉样品的最低检测限分别为 0.76、0.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。[结论] 这种方法与仪器检测结果相同, 与仪器分析技术相比具有检测成本低、高效便捷等优点, 适于肉制品中阿维菌素类药物的现场快速检测。

关键词 阿维菌素类药物; 虾肉; 鸡肉; 高效液相色谱-荧光检测法

中图分类号 TS207 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)09-0157-04

Determination of Avermectins Residues in Chicken and Shrimp by ELISA

CHENG Ru, WU Yu-e, CHEN Ji-xiang et al (Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co., Ltd., Guiyang, Guizhou 550009)

Abstract [Objective] The research aimed to verify the detection effect of self-developed avermectins kit. [Method] The indirect competitive ELISA was used to detect the residues of avermectins in chicken and shrimp, the results were compared with high performance liquid chromatography-fluorescence detection method. [Result] The average recoveries were 92.7%–98.6% of blank chicken and shrimp at 5, 10 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The coefficient of variation between intra batch and inter batch was less than 10%, the detection limit of chicken, shrimp samples were 0.76 and 0.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. [Conclusion] This method is the same as the instrument test results. Compared with the instrument analysis technology, this method has the advantages of low cost, high efficiency and convenient. It is suitable for rapid detection of avermectins in meat products.

Key words Avermectins (AVMs); Shrimp; Chicken; HPLC-FLD

阿维菌素类药物是由放线菌产生的一组大环内酯类抗生素, 其对线虫、体外节肢动物有较强的驱杀作用, 是目前应用最广泛的抗寄生虫类药物^[1-5]。但是此类药物的脂溶性较高, 且具有神经毒性和发育毒素, 在动物体内经过长时间的停留, 会对动物机体产生巨大伤害, 因此, 其被 WHO 列为高毒性化合物^[6]。中国、美国、欧盟、食品法典委员会等均制定了阿维菌素类药物的最高残留限量, 便于更好地加强此类药物的残留监测, 以保障我国食品安全。

阿维菌素类药物是带双糖支链的大环内酯类化合物, 其分子量较大, 极难被气化, 因而无法应用气相色谱检测其物质含量^[7-9]。目前主要的试验手段包括液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[10]、液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)^[11]、免疫亲和色谱技术(IAC)^[12-13]、液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[14]、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[15]及酶联免疫吸附法(ELISA)^[16]等。笔者采用建立的 ELISA 法检测鸡肉和虾肉样本中的阿维菌素类药物含量, 此法分析时间短、可操作性强, 并与高效液相色谱-荧光检测法进行比对验证, 以验证贵州勤邦食品安全科

学技术有限公司研制的阿维菌素类药物酶联免疫试剂盒的检测水平是否达到国家标准, 从而为动物源食品中阿维菌素类药物的快速检测提供符合要求的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本与试剂。 鸡肉、虾肉鲜肉(购自贵阳小河沃尔玛超市), 其中鸡肉取鸡胸脯肉、虾肉取虾身中间部位; 阿维菌素类药物试剂盒(贵州勤邦食品安全科学技术有限公司自主研发), 其中含有 96 孔酶标板、标准品 $\times 6$ 瓶(0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5 $\mu\text{g}/\text{L}$, 1 mL/瓶)、高浓度标准品(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 mL/瓶)、酶标二抗、抗体工作液、底物 A 液、底物 B 液、终止液、20 $\times$ 浓缩洗涤液、2 $\times$ 浓缩复溶液; 阿维菌素标准品, 纯度 $\geq 95\%$, 美国 Sigma 公司; 乙腈、正己烷(分析纯, 成都金山化学试剂有限公司)。

1.1.2 仪器与设备。 高速电动匀浆机(FTH-II型, 浙江中天机械厂); 恒温振荡器(CWZ-96B, 杭州雅极仪器制造有限公司); 高速离心机(GS39-3B, 上海先锋北利设备有限公司); 涡旋仪(ST-902 型, 江苏南京市奥华制造仪器厂); 分析天平(BLC-210.5 型, 德国 Sartorius 公司); 超声波振荡清洗器(GW SONIC-M4, 深圳固特超声责任有限公司); 微量移液器(单道 20~200、100~1 000 μL , 多道 250 μL , 美国 Thermo 公司); 高效液相色谱(配荧光检测器, LC-3000, 美国安捷伦公司)。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫法试验检测原理。 采用间接竞争酶联免疫吸附剂法(ELISA)测定样品中的阿维菌素类药物, 通过在酶标板微孔条上预包被偶联抗原, 则样本中残留的阿维菌素类

基金项目 2017 年贵州省工业和信息化发展专项资金计划(2017002); 2016 年贵阳市经济技术开发区科学技术计划项目“磺胺类、阿维菌素类药物快速检测实际开发及产业化”; 2016 年贵州省技术创新项目“慢抗快速检测试剂盒产业化”; 2016 年贵州省科技厅社会攻关计划项目(黔科合[2016]支撑 2908 号); 2017 年贵州省科技支撑项目(黔科合支撑[2017]2034); 贵阳市 2016 年人才创新创业资助项目(筑人才办合同字[2016]第 13 号)。

作者简介 程茹(1990—), 女, 陕西咸阳市人, 工程师, 硕士, 从事食品安全快速检测技术的研究与开发工作。* 通讯作者, 工程师, 硕士, 从事农产品质量安全检测技术应用研究。

收稿日期 2018-01-04

药物和酶标板微孔条上预包被的偶联抗原竞争抗阿维菌素类药物的抗体,加入酶标二抗后,用 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物显色,样本测定的吸光度与其所含残留物阿维菌素类药物的含量呈负相关,根据样本测定的吸光度,进一步通过标准曲线公式计算样本所对应的浓度,再乘以其对应的稀释倍数,即可计算出样本中阿维菌素类药物的残留量。

1.2.2 样品前处理。

1.2.2.1 溶液的配制。

(1)复溶工作液。用去离子水将 $2 \times$ 浓缩复溶液按 1:1 体积比进行稀释(1 份 $2 \times$ 浓缩复溶液 + 1 份去离子水),用于茶叶和蔬菜样本的稀释。复溶工作液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境可保存 1 个月。

(2)洗涤工作液。用去离子水将 $20 \times$ 浓缩洗涤液按 1:19 体积比进行稀释(1 份 $20 \times$ 浓缩洗涤液 + 19 份去离子水),用于酶标板的洗涤。洗涤工作液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境可保存 1 个月。

1.2.2.2 样本预处理。取 2 支 50 mL 经清洗、干燥、灭菌的聚苯乙烯离心管,各精确称取已经破碎均质处理的鸡肉、虾肉组织样本(3.00 ± 0.05)g,依次加入 9 mL 乙腈、3 mL 正己烷,在恒温振荡器中振荡 10 min,再以 3 000 r/min 的转速, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,离心 5 min。精确移取 1 mL 下层液于 10 mL 洁净干燥的玻璃试管中,将其置于 $50 \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流中吹干,再加入 1 mL 复溶工作液,用涡旋仪涡动 60 s,超声波溶解 10 min,再继续用涡旋仪涡动 60 s。移取 100 μL 溶解后的样本液,加入 100 μL 复溶工作液,用涡旋仪涡动 30 s,混匀,取 20 μL 用于分析。

1.2.3 样本中阿维菌素类药物的测定。试验前,需保证所有试验所用试剂回温至 $20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,且不起泡。从试剂盒中取出微孔板,将样本和阿维菌素药物的标准品对应微孔按序进行编号,各做 3 个平行,标记各自对应位置。一次加入阿维菌素药物标准品和样品各 20 μL 到对应的微孔中,再继续加入抗体工作液 80 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光静置 30 min。移走盖板膜,吸水纸吸干各孔中的液体,继而在各孔中加入 250 μL 洗涤工作液,每间隔 10 s 清洗 1 次,重复操作 5 次左右,直至清洗干净,最后用吸水纸拍干。

再以每孔 100 μL 的量加入酶标二抗,轻轻振荡均匀,盖板膜盖板后在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光静置 30 min,取出重复洗板工作。依次在各孔中加入底物液 A 液和 B 液各 50 μL ,混匀后继续用盖板膜盖板,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光环境进行显色反应 15 min,后在各孔中加入终止液 50 μL 后混匀,用酶标仪在波长 450 nm 处检测,5 min 内完成测定过程,读取每孔 OD 测定值。

1.2.4 样品中阿维菌素类药物浓度的计算。

1.2.4.1 百分吸光率。即为标准品或样品的平均吸光度(B)除以空白溶液的平均吸光度(B_0),再乘以 100%,表达公式如下:

$$\text{百分吸光率} = B/B_0 \times 100\%$$

1.2.4.2 标准曲线的绘制与虾肉样本阿维菌素类药物浓度

的计算。分别对 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5 $\mu\text{g/L}$ 6 个浓度梯度的标准液进行测定,以标准品百分吸光率测定值为纵坐标,阿维菌素类药物标准品浓度的对数为横坐标,绘制阿维菌素类药物的标准曲线,计算回归方程及相关系数,根据线性方程计算 IC_{50} 。

将样品的百分吸光率代入制作好的标准曲线中,可从标准曲线上读出样品所对应浓度,乘以其对应被稀释倍数,即可计算出样品中阿维菌素类药物的实际浓度。

1.2.5 阿维菌素类药物酶联免疫法测定试剂盒指标检测方法。分别对试剂盒的灵敏度、特异性、精密度、准确度进行试验,并与仪器分析进行比较。

1.2.5.1 灵敏度。评价免疫法试验反应灵敏度常用 IC_{50} 值和最低检测限表示, IC_{50} 值即为零标准溶液吸光度值的 50% 处对应的药物浓度,两者数值的大小与试剂盒的灵敏程度成反比。样品采集地区、种类、预处理方法等因素与最低限检测有较强的关联性,而 IC_{50} 则不受样本本身的影响,值相对不变。两者结合,可用于试验所用试剂盒灵敏度指标的评价。

分别检测 20 组空白鸡肉、虾肉样品,计算其所含阿维菌素类药物的含量,检测限为 $\text{LOD} = S + 3\text{ }SD$ (S 为阿维菌素类药物的浓度平均值, SD 为标准差),根据下面公式计算试剂盒检测实际样品的最低检测限。

$$\text{LOD} = X + 3 \sqrt{\frac{n \sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

式中, X 为试验重复测定空白样品的平均值; n 为试验测定样品数量。

1.2.5.2 特异性。特异性用交叉反应率表示,其是衡量抗体与各抗原决定簇结合能力强弱的指标,试验用一定浓度范围的阿维菌素类药物类似物取代阿维菌素类药物标准溶液,根据标准曲线公式,计算各药物交叉反应率,交叉反应率越低,抗体特异性越好。交叉反应率 = 引起 50% 抑制的阿维菌素浓度 / 引起 50% 抑制的阿维菌素类似物浓度 $\times 100\%$ 。

1.2.5.3 精密度、准确度。衡量测定方法对多研究样品重复测定数据的一致程度的指标用精密度表示,其是鉴定试剂盒品质最为基本的参数;准确度是试验测定值与真实值间符合性程度的指标,这一指标大小是通过样品回收率计算所得。

在检测结果为阴性的鸡肉、虾肉样本各添加 5、10 和 20 $\mu\text{g/kg}$ 的阿维菌素类药物,各设 6 个平行,根据试剂盒设计方法进行测定操作,计算样品的回收率。

1.2.5.4 试剂盒与仪器检测结果比较。分别对试剂盒和仪器检测结果进行灵敏度、精密度、准确度的对比。试剂盒检测方法根据试剂盒说明书步骤进行操作,仪器检测分析则参考《农业部 781 号公告 - 5 - 2006 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法》(动物源性食品中阿维菌素类药物的检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$) 进行操作。

2 结果与分析

2.1 标准曲线 以阿维菌素类药物标准品浓度的对数为横坐标,标准品百分吸光率为纵坐标,绘制标准曲线如图 1 所示。以阿维菌素类药物标准品浓度的对数(log)为横坐标,

抑制率 $\ln[B/(B_0 - B)]$ 为纵坐标建立双对数直线拟合曲线如图 2 所示,得标准曲线回归方程为: $y = -2.1248x + 0.4024$ ($R^2 = 0.9986$),说明试剂盒线性关系良好。

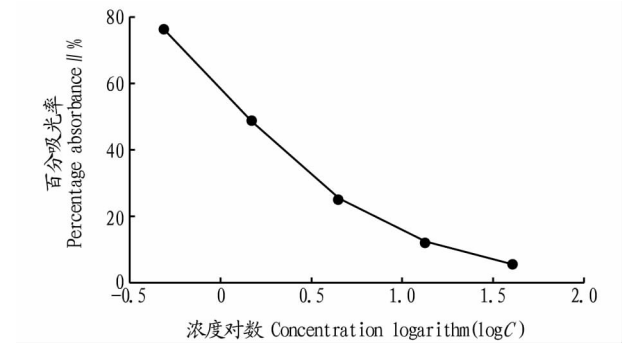


图 1 标准曲线
Fig.1 Standard curve

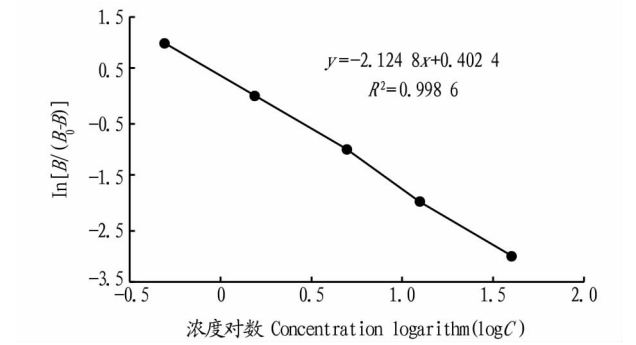


图 2 标准曲线方程
Fig.2 Standard curve equation

2.2 试剂盒灵敏度 由表 1 可知,空白鸡肉和虾肉样品的最低检测限分别为 0.76、0.89 $\mu\text{g/kg}$;试验测定得出的标准曲线的 IC_{50} 为 1.8 ~ 3.5 $\mu\text{g/L}$,平均值为 2.8 $\mu\text{g/L}$ 。综合以上 2 个数据可以得出,该试剂盒灵敏度高。

表 1 空白样本测定结果统计
Table 1 Measurement results statistics of blank sample $\mu\text{g/kg}$

样本 Sample	平均值 Average value	标准差 Standard deviation	最低检测限 Lowest detection limit
空白鸡肉 Blank chicken	0.44	0.11	0.76
空白虾肉 Blank shrimp	0.55	0.11	0.89

2.3 试剂盒特异性 试验测定结果得各药物的交叉反应率依次为阿维菌素 100%、伊维菌素 45%、埃比菌素 90%、多拉菌素 <10%,可见各药物的交叉反应率均不大于 100%,表明抗体的特异性均较高。

2.4 试剂盒准确度与精密度 从表 2 可知,阿维菌素在鸡肉、虾肉样品中的加样品回收率为 92.7% ~ 98.6%,其批内、批间变异系数均小于 10%,表明该款试剂盒符合且高于国家对试剂盒的备案标准。

2.5 与仪器方法的比较

2.5.1 灵敏度。准备 20 份随机抽取的市场在售的鸡肉、虾肉样本,2 种分析方法测定结果见表 3,以 2 $\mu\text{g/kg}$ 为阳性判定线,当样品实际检测结果低于这一判定线,则以“—”表示,高于或等于时则以实际测定值表示。从表 3 的检测结果中可得,2 种手段所得检测结果相近,从 11 号、15 号样品的检测结果验证,试剂盒的检测限较仪器更低,更易检测出阿维

表 2 阿维菌素准确度和精密度

Table 2 The Accuracy and precision of avimectin

样品 Sample	添加浓度 Adding concentration $\mu\text{g/kg}$	1 批 The first batch			2 批 The second batch			3 批 The third batch			批间 CV Inter batch %
		平均值 Average value $\mu\text{g/kg}$	回收率 Recovery rate %	CV %	平均值 Average value $\mu\text{g/kg}$	回收率 Recovery rate %	CV %	平均值 Average value $\mu\text{g/kg}$	回收率 Recovery rate %	CV %	
鸡肉 Chicken	5	4.92	98.4	9.5	4.79	95.8	8.5	4.79	95.8	13.1	9.2
	10	9.58	95.8	8.6	9.65	96.5	10.2	9.49	94.9	10.5	9.4
	20	19.64	98.2	8.5	19.39	97.0	9.6	18.99	95.0	11.6	8.9
虾肉 Shrimp	5	4.83	96.6	10.4	4.93	98.6	8.4	4.90	98.0	12.4	8.6
	10	9.49	94.9	9.5	9.27	92.7	9.0	9.54	95.4	9.5	9.8
	20	19.51	97.6	10.3	19.39	97.0	2.6	19.71	98.6	11.6	9.4

菌素类药物低残留的样品。由此可知,该试剂盒法的检测符合国家检测标准且优于仪器检测。

2.5.2 精密度和准确度。分别按照高效液相色谱和自制试剂盒检测提供的方法,以 5 $\mu\text{g/kg}$ 浓度对空白鸡肉、虾肉进行添加回收试验,比较仪器检测方法和自制试剂盒检测方法的平均回收率和变异系数。自制试剂盒检测方法中,将添加样品在 3 块不同酶标板上测定,做 4 个平行,计算变异系数。

由表 4 可知,鸡肉样品中 HPLC - FLD 的平均回收率为 95.2%,变异系数为 8.7%;ELISA 的平均回收率为 95.7% ~

98.5%,批内、批间变异系数均小于 10.0%。虾肉样品中 HPLC - FLD 的平均回收率为 95.6%,变异系数为 6.1%;ELISA 的平均回收率在 92.8% ~ 98.3%,批内、批间变异系数均小于 10.0%。结果表明自研试剂盒适于实际样品的阿维菌素类药物含量的快速精准检测。

3 结论

采用间接竞争 ELISA 法对鸡肉和虾肉中阿维菌素类药物的残留量进行检测,并与高效液相色谱法进行比对。结果表明,自主研发的阿维菌素类药物 ELISA 检测试剂盒灵敏度高,特异性好,准确度与精密度均满足我国兽药残留分析的

表 3 自研试剂盒与仪器方法灵敏度比较

Table 3 Compare of sensitivity of the experimental kit and the instrument method

样品号 Sample number	鸡肉 Chicken		虾肉 Shrimp	
	ELISA	HPLC – FLD	ELISA	HPLC – FLD
1	—	—	—	—
2	3.9	3.8	—	—
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	—	—	2.6	2.7
6	—	—	—	—
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	—
10	—	—	—	—
11	1.5	—	—	—
12	—	—	4.3	4.5
13	—	—	—	—
14	—	—	—	—
15	—	—	1.8	—
16	—	—	—	—
17	—	—	—	—
18	—	—	—	—
19	—	—	—	—
20	—	—	—	—

表 4 精密度和准确度吻合情况检测结果

Table 4 The consistent detection results of precision and accuracy

样本 Sample	方法 Method	平均回收率 Average recovery rate	批内变异系数 Variation coefficient of intra batch	批间变异系数 Variation coefficient of inter batch
鸡肉 Chicken	ELISA	95.7	6.8	7.6
		96.8	5.4	
		98.5	8.6	
虾肉 Shrimp	HPLC – FLD	95.2	8.7	—
		98.3	4.5	8.4
	ELISA	92.8	8.1	
		97.4	7.2	
		HPLC – FLD	95.6	6.1

(上接第 142 页)

力,特别是过氧化氢形成有关^[5]。根据图 2 结果,推测 GPx 活性降低可能与黄鲫蛋白抗菌肽 – 纳米氧化锌络合物具有较强自由基生成能力有关,进而导致 MDA 含量的增加,但是 MPO 活性增加和 LPO 降低原因还有待于进一步深入研究。

3 结论

黄鲫蛋白抗菌肽 – 纳米氧化锌络合物的微观结构显示,在纳米氧化锌表面有肽类生物分子层形成,对纳米氧化锌有包裹作用,而小鼠肠道注射了该络合物后,肠黏膜中 MPO 活性增强,LPO 含量降低;但是,另外一种过氧化物酶 GPx 的含量则是显著地降低,同时 MDA 含量增加。该研究说明,黄鲫蛋白抗菌肽 – 纳米氧化锌络合物对小鼠肠道关键酶活性有改变作用,但是具体吸收方式及酶活性改变机制还需后续深入探究。

参考文献

[1] ALFADUL S M,ELNESHWY A A. Use of nanotechnology in food processing,packaging and safety-review[J]. Africa journal of food agricultural and nutrition development,2010,10(6):2719 – 2739.

[2] SONG R,WEI R B,ZHANG B,et al. Optimization of the antibacterial ac-

要求。该方法与仪器检测结果一致,但其检测成本低、耗时短、操作时间短,能大大减少操作误差和工作强度,可满足动物源性食品中阿维菌素类药物的现场批量快速检测需求。

参考文献

[1] 沈建忠,谢联金. 兽医药理学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000.

[2] 李俊锁,邱月明. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002.

[3] 扈洪波,朱蓓蕾,李俊锁. 阿维菌素类药物的研究进展[J]. 畜牧兽医学报,2000,31(6):520 – 529.

[4] 聂奎,曾中良,余鹏南,等. 阿维菌素族抗寄生虫药物的研究[J]. 四川畜牧兽医学院学报,2000,14(4):42 – 47.

[5] 莫云. 阿维菌素的残留分析及其洗涤剂在兔体内残留消除规律的研究[D]. 北京:中国农业大学,1998.

[6] 陈静,罗永煌. 阿维菌素类药物在动物性食品中的残留检测研究概况[J]. 贵州畜牧兽医,2007,31(4):9 – 11.

[7] VIRANT CELESTINA T,KOLAR L,GOBEC I,et al. Factors influencing dissipation of avermectins in sheep faeces[J]. Ecotoxicology & environmental safety,2010,73(1):18 – 23.

[8] 张文娟,连庚寅,郭晓喜,等. 超高效液相色谱 – 串联质谱法测定 10 种食品中的阿维菌素类药物残留[J]. 食品科学,2012,33(18):226 – 231.

[9] 何继红,申屠芬琴. 阿维菌素类药物残留分析技术研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(5):98 – 100.

[10] 孙世伟,李修炼,李科明,等. 黄精中阿维菌素残留量检测方法研究[J]. 西北植物学报,2007,27(6):1151 – 1155.

[11] 赵莉,谢显传,占绣萍. 高效液相色谱 – 荧光法同时检测蔬菜中阿维菌素、甲氨基阿维菌素苯甲酸盐和伊维菌素的多残留量[J]. 中国农业科学,2010,43(16):3467 – 3472.

[12] 谢显传,张少华,王冬生,等. 柱前衍生高效液相色谱法测定果蔬产品中阿维菌素及其有毒代谢物的残留量[J]. 中国农业科学,2005,38(11):2254 – 2260.

[13] 杨君宏,何继红,侯晓林,等. 牛肌肉中阿维菌素类药物残留的免疫亲和色谱 – 高效液相色谱荧光检测方法的研究[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(1):243 – 245.

[14] 宫小明,董静,孙军,等. 动物源性食品中阿维菌素类药物残留的 QuEChERS – 液质联用法测定[J]. 分析测试学报,2010,29(9):933 – 937.

[15] 杨方,杨守深,林永辉,等. 超高效液相色谱 – 电喷雾电离串联质谱联用法检测茶叶中阿维菌素类药物残留[J]. 色谱,2009,27(2):153 – 157.

[16] 赵卫东,郑文杰,贺艳,等. 酶联免疫法检测动物源性产品中阿维菌素残留[J]. 食品研究与开发,2009,30(4):127 – 130.

tivity of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) hydrolysates[J]. Food bioprocess and technology,2012,5(5):1979 – 1989.

[3] SONG R,WEI R B,RUAN G Q,et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. LWT-Food Science and Technology,2015,60(1):221 – 229.

[4] SONG R,WEI R B,ZHANG B,et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heated sterilized pepsin hydrolysate derived from half-fin anchovy (*Setipinna taty*) [J]. Marin drugs,2011,9(6):1142 – 1156.

[5] SONG R,SHI Q Q,ABDRABBOH G A A,et al. Characterization and antibacterial activity of the nanocomposite of half-fin anchovy (*Setipinna taty*) hydrolysates/zinc oxide nanoparticles[J]. Process biochemistry,2017,62:223 – 230.

[6] BÄUMLER A J,SPERANDIO V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut[J]. Nature,2016,535(7610):85 – 93.

[7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical biochemistry,1976,72(1/2):248 – 254.

[8] BHUNIA A K,KAMILIYA T,SAHA S. Synthesis,characterization of ZnO nanorods and its interaction with albumin protein[J]. Materials today:Proceedings,2016,3(2):592 – 597.

[9] DOCTER D,WESTMEIER D,MARKIEWICZ M,et al. The nanoparticle biomolecule corona:Lessons learned-challenge accepted? [J]. Chemical society reviews,2015,44(17):6094 – 6121.

[10] KELEŞTEMUR S,ALTUNBEK M,CULHA M. Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins[J]. Applied surface science,2017,403:455 – 463.