

ELISA 法测定微生物谷氨酰胺转氨酶残留量

张迪, 惠希武, 曹卫荣, 盖文丽, 李银贵*

(石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035)

摘要 目的: 建立微生物谷氨酰胺转氨酶(microbial transglutaminase, MTGase)残留量检测的酶联免疫吸附法(ELISA法), 并进行方法学验证, 用于 MTGase 催化偶联的生物制品的质量控制。**方法:** 利用 MTGase 单抗和 MTGase 兔多抗, 建立了 MTGase 的双抗体夹心 ELISA 方法, 并验证了该方法的定量限、精密度和准确度、稀释可靠性、稳定性和专属性等, 对 3 批 PEG-IFN α 2a 原液进行重复测定。**结果:** 该方法的定量限为 $0.165\sim 10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $0.05\sim 40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内拟合度高, $R^2>0.99$, 板内和板间精密度和准确度均在 $(\pm)15\%$ 以内; 样品经不同倍数稀释后, 回归计算样品的准确度在 $\pm 15\%$ 以内, 精密度小于 15% ; 样品室温放置 2 h 或冻融 1 次和 3 次, 结果显示质控样品采用该方法检测的精密度均小于 15% , 回收率为 $80\%\sim 120\%$; 应用该方法在不同稀释倍数的 PEG-IFN α 2a 原液中适量添加 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质控样品, 结果显示加标样品回收率为 $97.7\%\sim 101.1\%$ 。3 批 PEG-IFN α 2a 原液 MTGase 残留量重复测定的板内和板间精密度均在 15% 以内, MTGase 的残留量均低于总蛋白含量的 0.01% 。**结论:** ELISA 法可用于生物制品中 MTGase 残留量的检定。

关键词: 微生物谷氨酰胺转氨酶; 聚乙二醇化蛋白类药物; 聚乙二醇重组人干扰素; 定点偶联; 残留量检测; 方法学验证; 酶联免疫吸附测定法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)01-0124-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.01.16

Determination of residual microbial transglutaminase by ELISA

ZHANG Di, HUI Xi-wu, CAO Wei-rong, GE Wen-li, LI Yin-gui*

(CSPC Zhongqi Pharmaceutical Technology (SJZ) CO., LTD., Shijiazhuang 050035, China)

Abstract Objective: To establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of residual microbial transglutaminase (MTGase) for the quality control of the biologics which are catalyzed conjugation by MTGase. **Methods:** A double antibody sandwich-ELISA detection method using MTGase monoclonal antibody and MTGase rabbit polyclonal antibody was established for quantitative detection of MTGase. We had verified the limit of quantitation (LOQ), precision and accuracy, dilution reliability, stability, and specificity of the method. The method was used for repeated determination of residual MTGase in three batches of PEG-IFN α 2a bulk. **Results:** The detection LOQ of the method was $0.165\sim 10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, the ELISA method for residual MTGase had good linearity ($R^2>0.99$) in the concentration range of $0.05\sim 40.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, intra- and inter-assay

* 通信作者 Tel: (0311) 88381108; E-mail: liyingui@mail.ecspc.com

第一作者 Tel: (0311) 88381100-819; E-mail: zhangdi@mail.ecspc.com

precision was less than 15% and the accuracy varied between -15% and 15%; Using the method to analyze different times dilution QC samples, the precision and accuracy were both less than ($\pm$) 15%; Leaving the samples at room temperature for 2 hours or freeze-thaw 1 and 3 times, the results showed that the detection precision of reference samples was less than 15% and recoveries were between 80% and 120%. The PEG-IFN α 2a solution with different dilution times was added to the $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ reference solution, the average recoveries of standard addition were between 97.7% and 101.1%. The method was used for the determination of residual MTGase in three batches of PEG-IFN α 2a bulk, the results indicated that the intra- and inter-assay precisions were less than 15%, and the residual MTGase content was lower than 0.01% of the total protein content. **Conclusion:** The ELISA method can be used for the determination of residual MTGase in biologics.

Keywords: MTGase; pegylated protein drugs; PEG-IFN; site-specific conjugation; residues detection; method validation; ELISA

蛋白类药物因其疗效好且毒性低,目前已成为全球医药市场上增速最快的药物种类之一,具有巨大的市场前景。但是此类药物半衰期短,需频繁注射,且易产生免疫原性而限制了其应用。聚乙二醇化(pegylation, PEG)蛋白类药物在最大限度地保留其生物活性的同时,降低其免疫原性,延长半衰期,使用更方便,临床应用上更受欢迎^[1]。

传统的聚乙二醇修饰多为随机修饰,选择性不高,修饰后的蛋白分子不均一,活性降低等。而定点修饰有利于保持蛋白质或多肽的活性,能获得某一特定修饰位点均一的聚乙二醇化产物,有利于产品质量控制和工业化生产,已成为聚乙二醇修饰蛋白质、多肽类药物的研究热点^[2-3]。

微生物谷氨酰胺转氨酶(microbial transglutaminase, MTGase)能催化PEG对蛋白或多肽的某些特定氨基酸进行定点修饰。其优势在于不需要对原蛋白的结构进行改造,最少程度地影响原蛋白的理化和结构特性,而且可用 *E. coli* 工程菌表达,来源方便,还能简化下游纯化工艺,降低生产成本^[4-5]。而在MTGase连接的聚乙二醇化蛋白类药物的质量控制中,有必要对残留的MTGase进行检测^[6]。本文采用双抗体夹心ELISA法,以聚乙二醇重组人干扰素 α 2a(PEG-IFN α 2a)为例,建立了灵敏、快速的MTGase残留量测定方法,并按照2015年版中国药典要求验证了该方法的定量限、精密度和准确度、稀释可靠性、稳定性和专属性等,对3批PEG-IFN α 2a原液进行了重复测定。

1 仪器与试剂

1.1 耗材与仪器

Synergy HT酶标仪和Elx405洗板机为BioTek公

司产品;酶标板(货号9018)购自Corning公司。

1.2 药品与试剂

供试品PEG-IFN α 2a原液由石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司制备;包被液(碳酸盐缓冲液, pH 9.4, 货号28382, 批号ME157723A)为Thermo公司产品;山羊抗兔IgG F(ab)'₂-HRP(货号A24537, 批号46-22-020315)为Novex公司产品;TMB双组分显色试剂盒(货号TS0001, 批号20150825)为天舜生物科技有限公司产品;MTGase对照品($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 批号20131014)、MTGase单抗(批号20150622)、MTGase兔多抗(批号20150504)均由Dophen Biomed Corporation提供。

2 实验方案

2.1 实验步骤

2.1.1 试剂配制 磷酸盐缓冲液(PBS): 氯化钠8.0 g, 磷酸氢二钠1.44 g, 氯化钾0.2 g, 磷酸二氢钾0.2 g, 1 L纯水溶解, 调pH至7.4; 封闭液: 含1%牛血清白蛋白(BSA)的PBS; 样品稀释液: 含0.1%BSA的PBS; 洗涤缓冲液: PBST, 含0.05%吐温-20的PBS; 终止液: $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸。

2.1.2 标准曲线的制备 用包被液将MTGase单抗稀释至 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔100 μL , 室温震荡8 h, 4°C 封闭过夜后, PBST洗板3次; 用样品稀释液3倍系列稀释MTGase对照品, 制备质量浓度分别为40.00、13.33、4.44、1.48、0.49、0.16、0.05 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准样品, 每孔100 μL , 室温震荡1 h后, PBST洗板3次; 加入5 000倍稀释的MTGase兔多抗, 每孔100 μL , 室温震荡1 h后, PBST洗板3次; 加入山羊抗兔IgG F(ab)'₂-HRP, 3 000倍稀释, 每孔100 μL , 室温震荡1 h后,

PBST洗板3次,PBS洗板1次;TMB显色3~5 min后加终止液终止反应,酶标仪450 nm读数,制备标准曲线,选用的回归模型为四参数方程。

2.2 方法学验证实验方案

2.2.1 方法的定量限 将MTGase对照品稀释至13.33、10、0.165和0.055 ng·mL⁻¹,按照“2.1.2”项的方法对4个浓度的溶液板内重复5次测定,计算精密度和准确度,按照《生物样品定量分析方法验证指导原则》^[7]要求,定量限的准确度应在±20%以内,精密度小于20%。

2.2.2 方法的重复性 按照“2.1.2”项下方法制备高、中、低3个浓度(4.44、1.48和0.49 ng·mL⁻¹)的MTGase质控样品,板内每个质控浓度重复测定10次;板间每个质控浓度3个平行,重复3次测定;计算其精密度和准确度。

2.2.3 稀释可靠性 根据该方法的检测范围,样品检测前需进行稀释,因此应进行方法的稀释可靠性考察。用样品稀释液将质量浓度为40 ng·mL⁻¹的标准样品分别稀释10、20、80、160倍后,得到4、2、0.5、0.25 ng·mL⁻¹4个浓度的质控样品,按照“2.1.2”项的方法,每个浓度重复测定5次,计算准确度和精密度。

2.2.4 稳定性 考虑到样品分装及部分样品需要重复检测,有必要考察其冻融稳定性。用样品稀释液配制高、中、低3个浓度(4.44、1.48和0.49 ng·mL⁻¹)的质控样品,冻融1次和3次后进行检测;另外,样品在检测过程中需要在室温(20~30℃)放置一段时间,因此需要对其室温放置稳定性进行考察,将配制的高、中、低3个浓度(4.44、1.48和0.49 ng·mL⁻¹)的质控样品室温放置2 h后进行测定。每个浓度5次重复测定,样品的回收率应在理论值的80%~120%之间。

2.2.5 专属性 检测PEG-IFNα2a原液中MTGase残留,需对该方法进行专属性验证。溶液I:用样品稀释液将PEG-IFNα2a原液稀释2.5、5、10、20和40倍备用,5、10、20和40倍稀释的供试品即为溶液I;溶液II:上述2.5、5、10和20倍稀释的供试品和5 ng·mL⁻¹的标准样品分别等量混合即为溶液II,重复测定3次;溶液III:用样品稀释液2倍稀释5 ng·mL⁻¹的标准样品,重复6次测定。溶液I与溶液II的含量之差应在溶液III含量测定值的95%可信区间内($\bar{x} \pm 2SD$),表明供试品不会对该检测法产生干扰作用。当结果大于可信区间时,提示样品或缓冲液对检测有增强作用;当结果小于可信区间时,提示样品或

缓冲液对检测有抑制作用^[8]。

2.3 样品检测

取3批PEG-IFNα2a原液,用样品稀释液10倍稀释样品,按照“2.1.2”项的方法操作,测定MTGase残留,每批样品重复测定3次,每次3个平行,计算板内和板间精密度。

3 实验结果

3.1 标准曲线

在标准曲线0.05~40 ng·mL⁻¹范围内,将质量浓度对数值和吸收值进行经四参数拟合,得到一条S型曲线,曲线 $R^2 > 0.99$ (图1),供试品吸收值经曲线方程计算可得对应的含量。

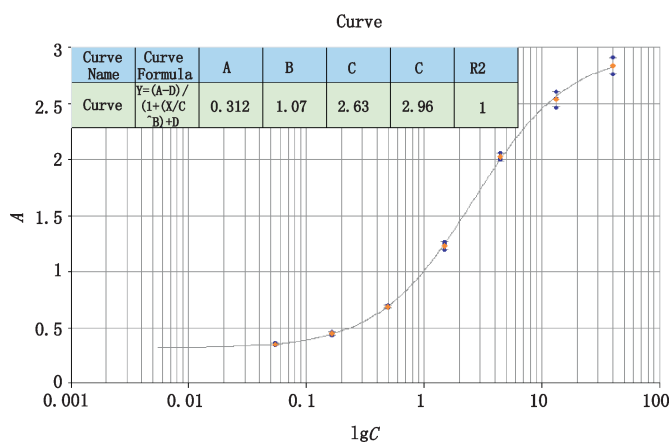


图1 对照品浓度吸光度曲线拟合

Fig. 1 Standard curve fitting of concentration absorbance of the control

3.2 方法学验证结果

3.2.1 方法的定量限 应用本方法对13.33、10、0.165和0.055 ng·mL⁻¹ MTGase溶液板内重复5次测定,结果13.33 ng·mL⁻¹溶液测定平均值为12.38 ng·mL⁻¹,精密度为24.09% ($n=5$),准确度为-7.13% ($n=5$),精密度大于20%,不符合《生物样品定量分析方法验证指导原则》对定量上限的要求;10 ng·mL⁻¹溶液测定平均值为9.26 ng·mL⁻¹,精密度5.22% ($n=5$),准确度-7.43% ($n=5$),绝对值均在20%以内。0.055 ng·mL⁻¹溶液测定平均值为0.071 ng·mL⁻¹,精密度为12.68% ($n=5$),准确度为29.09% ($n=5$),准确度大于20%,不符合《生物样品定量分析方法验证指导原则》对定量下限的要求;0.165 ng·mL⁻¹溶液测定平均值为0.166 ng·mL⁻¹,精密度1.79% ($n=5$),准确度0.60% ($n=5$),均在20%以内,因此将该方法定量上限设为10 ng·mL⁻¹,定量下限设为0.165 ng·mL⁻¹。

3.2.2 方法的重复性 高、中、低浓度的质控样品分

别进行板内 10 次和板间 3 次重复检测,计算出其板内精密度 2.50%~5.89% ($n=10$),准确度 -1.93%~-4.53% ($n=10$); 3 次测定的板间精密度和准确度见表

1,其板内和板间精密度和准确度均在 ($\pm$) 15% 以内,符合《生物样品定量分析方法验证指导原则》对该检测方法的要求。

表 1 方法的板间重复性

Tab. 1 The reproducibility of the method between plates

质控样品质量浓度 (mass concentration of QC sample)/(ng • mL ⁻¹)	测定次数 (times)	MTGase 质量浓度 (mass concentration of MTGase)/(ng • mL ⁻¹)		SD	RSD/%	准确度 (accuracy)/%
		$\bar{x} \pm SD$	平均值 (mean)			
4.44	1	4.446 ± 0.006 (0.13)	4.432	0.030	0.68	-0.180
	2	4.453 ± 0.105 (2.36)				
	3	4.398 ± 0.194 (4.41)				
1.48	1	1.471 ± 0.036 (2.45)	1.475	0.011	0.75	-0.338
	2	1.488 ± 0.042 (2.82)				
	3	1.467 ± 0.071 (4.84)				
0.49	1	0.491 ± 0.012 (2.44)	0.487	0.012	2.46	-0.612
	2	0.497 ± 0.009 (1.81)				
	3	0.473 ± 0.019 (4.02)				

注 (note): 括号内的值为 RSD (RSD in the parentheses, %)

3.2.3 稀释可靠性 40 ng · mL⁻¹ 的标准样品分别稀释 10、20、80、160 倍后得到 4、2、0.5 和 0.25 ng · mL⁻¹ 4 个浓度,每个浓度测定 5 次,结果各稀释度精密度在 4.19%~7.49% ($n=5$) 之间,准确度 -5.76%~-12.28% ($n=5$),可见应用本方法测定的准确度在 $\pm 15\%$ 以内,精密度小于 15%,表明不同稀释倍数对该检测方法无显著影响。

3.2.4 稳定性 稳定性验证结果见表 2、3 所示,高、中、低浓度质控样品冻融 1 次和 3 次或室温放置 2 h 后,分别重复测定,每个浓度测定 5 次。结果显示应用本方法测定的精密度在 1.00%~9.82% 之间,回收率在 83.1%~116.7% 之间,表明 MTGase 在以上存放条件下是稳定的。

表 2 冻融稳定性

Tab. 2 Stability of the freeze-thaw

质控样品质量浓度 (mass concentration of QC sample)/(ng · mL ⁻¹)	冻融次数 (times)	平均值(mean)/ (ng · mL ⁻¹)	SD	RSD/%	回收率 (recovery) /%
4.44	1	4.469	0.242	5.42	100.7
	3	4.778	0.179	3.74	107.6
1.48	1	1.459	0.036	2.49	98.6
	3	1.350	0.014	1.00	91.2
0.49	1	0.407	0.015	3.70	83.1
	3	0.415	0.010	2.50	84.7

表 3 室温放置稳定性

Tab. 3 The stability at RT

质控样品质量浓度 (mass concentration of QC sample)/(ng · mL ⁻¹)	平均值 (mean)/ (ng · mL ⁻¹)	SD	RSD/%	回收率 (recovery)/%
4.44	5.183	0.509	9.82	116.7
1.48	1.575	0.058	3.68	106.4
0.49	0.518	0.027	5.21	105.7

3.2.5 专属性 取溶液Ⅲ (2.5 ng · mL⁻¹) 共检测 6 次,计算均值 ($\bar{x}=2.63$ ng · mL⁻¹) 和标准偏差 (SD=0.08),加了对照品的溶液Ⅱ和相应倍数稀释的溶液Ⅰ的差值 (见表 4) 位于 $\bar{x} \pm 2SD$ 区间 (2.47~2.79 ng · mL⁻¹) 内,检测结果位于添加量 2.5 ng · mL⁻¹ 的 80%~120% 之间,说明不同倍数稀释的 PEG-IFN α 2a 原液对该方法均无干扰。

表 4 方法的专属性

Tab. 4 The specificity of the method

样品 (sample)	稀释倍数 (dilution times)	平均值 (mean)/(ng·mL ⁻¹)	SD	回收值 (recovery)/(ng·mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/%
溶液 I (solution I)	5	1.68	0.03	—	—
	10	0.86	0.02	—	—
	20	0.48	0.01	—	—
	40	0.25	0.01	—	—
溶液 II (solution II)	5	4.26	0.25	2.58	98.1
	10	3.45	0.08	2.59	98.5
	20	3.14	0.15	2.66	101.1
	40	2.82	0.10	2.57	97.7

3.3 样品检测

按照已建立的方法检测 3 批 PEG-IFN α 2a 原液中 MTGase 残留,结果见表 5,可见本方法测定的

3 批样品板内和板间精密度均低于 15%,3 批样品中 MTGase 的残留量均低于总蛋白含量的 0.01%,符合本实验室对 MTGase 残留量的要求。

表 5 3 批 PEG-IFN α 2a 原液中 MTGase 残留Tab. 5 The MTGase residues in three batches of PEG-IFN α 2a solution

批号 (lot No.)	样品含量 (sample content)/(mg·mL ⁻¹)	测定次数 (times)	MTGase 残留量 (residual amount of MTGase)/(ng·mL ⁻¹)		SD	RSD/%	残留量 (residue)/%
			$\bar{x} \pm SD$	mean			
CSPC01	1.38	1	13.71 $\pm$ 0.11 (0.80)	13.40	0.38	2.82	0.001 0
		2	12.98 $\pm$ 0.67 (5.14)				
		3	13.51 $\pm$ 0.62 (4.59)				
CSPC02	1.14	1	9.57 $\pm$ 1.20 (12.52)	9.88	0.28	2.85	0.000 9
		2	9.96 $\pm$ 1.07 (10.71)				
		3	10.12 $\pm$ 0.97 (9.57)				
CSPC03	1.15	1	10.15 $\pm$ 1.49 (14.63)	10.25	1.50	14.60	0.000 9
		2	11.79 $\pm$ 0.35 (2.94)				
		3	8.80 $\pm$ 0.42 (4.75)				

注 (note): 括号内的值为 RSD (RSD in the parentheses)

4 讨论

谷氨酰胺转氨酶 (transglutaminase, TGase) 广泛存在于动物、植物和微生物体内,可催化蛋白质与伯胺间的酰基转移反应,形成 ϵ -(γ -谷酰基)-赖氨酸键,被称为天然生物粘合剂^[9]。Sato 等^[10-11]于 1996 年发现 TGase 可用于蛋白的定点修饰,2001 年又利用 MTGase 对此连接反应进行了优化。MTGase 相对其他来源的 TGase 而言,因其可通过发酵大量获得,来源方便,生产成本相对低廉,并且其活性对 Ca²⁺ 无依赖性,底物范围更广等优点而被广泛应用^[12-13]。

通过 MTGase 酶催化蛋白修饰技术,不仅仅是对

干扰素,可以对一系列的蛋白或抗体药物进行修饰,在不改变蛋白或抗体结构的基础上对蛋白或多肽的某些特定氨基酸进行定点修饰,提高产品的稳定性。

ELISA 法,自 1971 年 Engvall 和 Pernann 首次建立以来,发展十分迅速,目前已被广泛应用于生物学和医学科学的许多领域。ELISA 法以免疫反应为基础,将抗原抗体的特异性反应与酶对底物的高效催化作用结合起来,具有灵敏高和特异性强等优点,并且结果准确,重复性好,方法操作简单且样品处理量大,现已成为药物残留分析中常用的分析技术之一^[14]。国内外对 MTGase 检测技术的研究尚少,李

铁等人建立了 MTGase 含量的检测方法,但该方法定量下限为 $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性检测范围为 $0.6 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[15],不能满足痕量 MTGase 的检测要求。本实验室建立的 MTGase 残留量检测方法,线性检测范围为 $0.165 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测范围广,定量下限远低于已有的方法。对该方法按照中国药典的要求进行了方法学验证,结果表明该方法在 $0.05 \sim 40.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内拟合良好,其精密度、准确度、专属性和稳定性等均符合指导原则的要求。应用该方法对 PEG-IFN α 2a 原液进行了测定,结果表明 PEG-IFN α 2a 对 MTGase 残留量的检测不存在干扰,该方法能稳定测定 PEG-IFN α 2a 中 MTGase 的残留量,在用于其他 MTGase 偶联药物中 MTGase 残留量的检测时仅需补充专属性验证即可,是 MTGase 残留量检测的理想方法。

参考文献

- [1] FOSER S, SCHACHER A, WEYER KA, *et al.* Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS) [J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 30(1): 78
- [2] ROSENDAHL MS, DOHERTY DH, SMITH DJ, *et al.* A long-acting, highly potent interferon alpha-2 conjugate created using site-specific PEGylation [J]. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(1): 200
- [3] 王凤山, 赵婷, 袁勤生. 蛋白质和多肽的 PEG 定点修饰研究进展 [C]//2007 年全国生化与生物技术药物学术年会论文集. 北京: 中国药学会, 2007: 2321
- WANG FS, ZHAO T, YUAN QS. Research progress in site-specific PEGylation of protein and peptide [C]// *Proceedings of The 2007 Biochemical and Biotech Drugs Academic Convention*. Beijing: Chinese Pharmaceutical Association, 2007: 2321
- [4] HU S, YIN YF. Transglutaminase for protein drug modification: pegylation and beyond [M]// TAO J, KAZLAUSKAS R. *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011: 151
- [5] 叶梦情, 李卫芬, 陈慧来, 等. 微生物谷氨酰胺转氨酶 (MTGase) 的分子生物学研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(24): 138
- YE MQ, LI WF, CHEN HL, *et al.* Progress of molecular research of microbial transglutaminase [J]. *Chin Agric Bull*, 2013, 29(24): 138
- [6] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 97
- WANG JZ. *Development and Quality Control of Biopharmaceuticals* [M]. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2007: 97
- [7] 中国药典 2015 年版. 四部 [S]. 2015: 363
- ChP 2015. Vol IV [S]. 2015: 363
- [8] 李娟, 陈震, 霍子威, 等. 残余牛血清白蛋白含量检测试剂盒抗干扰研究 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2010, 38(4): 39
- LI J, CHEN Z, HUO ZW, *et al.* Investigation of residual bovine serum albumin (BSA) testing kit interfering factors [J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2010, 38(4): 39
- [9] GRIFFIN M, CASADIO R, BERGAMINI CM. Transglutaminases: nature's biological glues [J]. *Biochem J*, 2002, 368(Pt 2): 377
- [10] SATO H, IKEDA M, SUZUKI K, *et al.* Site-specific modification of interleukin-2 by the combined use of genetic engineering techniques and transglutaminase [J]. *Biochemistry*, 1996, 35(40): 13072
- [11] SATO H, HAYASHI E, YAMADA N, *et al.* Further studies on the site-specific protein modification by microbial transglutaminase [J]. *Bioconjug Chem*, 2001, 12(5): 701
- [12] 包莹玲, 潘力. 微生物谷氨酰胺转氨酶作用机制及检测方法研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2008, 29(7): 265
- BAO YL, PAN L. Research progress of mechanism and activity assay of microbial transglutaminase [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2008, 29(7): 265
- [13] YOKOYAMA K, NIO N, KIKUCHI Y. Properties and applications of microbial transglutaminase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(4): 447
- [14] 王兰, 毕华, 饶春明. 应用 ELISA 测定睫状神经营养因子中卡那霉素残留量 [J]. *药物分析杂志*, 2011, 31(6): 1064
- WANG L, BI H, RAO CM. Determination of residual kanamycin in ciliary neurotrophic factor (CNTF) by ELISA [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2011, 31(6): 1064
- [15] 李铁. 冷冻鱼糜中微生物谷氨酰胺转氨酶检测方法的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2015
- LI Y. *Study on Detection Methods of Microbial Transglutaminase in Frozen Surimi* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015

(本文于 2017 年 10 月 10 日修改回)