

朱爱荣, 霍如林, 张 林, 等. 氟苯尼考多克隆抗体的制备及其鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 201–204.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.065

氟苯尼考多克隆抗体的制备及其鉴定

朱爱荣, 霍如林, 张 林, 高 峰, 周光宏

(南京农业大学动物科技学院/江苏省动物源食品生产与安全保障重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要:为了制备可用于检测氟苯尼考的特异性多克隆抗体, 采用戊二醛法合成氟苯尼考的人工抗原 FFA-BSA、FFA-OVA、紫外分光光度计进行鉴定, 用 FFA-BSA 免疫 BALB/C 雌性小鼠获得可用于检测氟苯尼考的特异性多克隆抗体, 并用间接 ELISA 法对其进行特异性鉴定。结果显示: 经过紫外扫描鉴定, 成功合成了人工抗原 FFA-BSA 和 FFA-OVA, 偶联比分别为 12:1 和 11:1。制备的抗体效价低于 1:32 000, 抑制率为 50% (IC_{50}) 时的氟苯尼考浓度为 36.9 ng/mL。可见, 本试验制备的氟苯尼考多克隆抗体具有较好的亲和力和高特异性, 有良好的应用价值。

关键词:氟苯尼考; 人工抗原; BALB/C 雌性小鼠; 多克隆抗体

中图分类号: S859.79⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0201-04

氟苯尼考 (florfenicol, FF) 别称氟甲砒霉素, 具有抗菌广谱、吸收速度快、体内分布广、无潜在性再生障碍性贫血等优点^[1], 因此, 氟苯尼考被广泛使用在水产、畜禽养殖中, 用于防治动物的感染性疾病^[2]。然而, 在动物生产中, 氟苯尼考的不规范使用和滥用导致其在动物食品中产生残留, 进而对消费者健康构成潜在威胁, 产生血液系统毒性^[3]和胚胎毒性^[4]; 动物用药后甚至会出现短暂的厌食、腹泻和炎症等不良反应^[3-4], 因此, 国内外相继规定了氟苯尼考在动物性食品中的最高残留限量^[2]。目前, 关于氟苯尼考的检测方法较多, 主要包括高效液相色谱法^[5-6]、气相色谱法^[7]、气质联用^[8]、液质联用^[9-10]和免疫学方法^[11-12]等。理化分析法对操作人员要求苛刻, 需要昂贵的设备, 样品前处理时间长, 不适合大批量样品的筛选; 而免疫学方法相对简单、快速和经济; 胶体金免疫层析技术是以胶体金为标记物的免疫层析方法, 具有携带方便、操作简单、特异敏感、成本低、不需仪器或仅需简单仪器、肉眼几分钟即可观察到试验结果的优点, 适合现场检测^[13-14]。制备好的抗体是免疫学检测的前提条件。氟苯尼考是小分子物质, 其化学结构式见图 1, 分子量为 358.22, 本身没有免疫原性, 目前还未见到关于氟苯尼考的快速检测试纸条的报道。本试验通过氟苯尼考的改造体氟苯尼考胺与载体蛋白相偶联合成人工抗原, 并用人工抗原免疫小鼠获得高特异性抗体, 为研制快速检测氟苯尼考残留的胶体金免疫层析试纸条奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2014-03-19

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号: 2012BAD28B03); 江苏省农业三新工程项目 [编号: SX(2011)146]。

作者简介: 朱爱荣 (1990—), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事动物营养调控与畜产品品质研究。Tel: (025) 84399007; E-mail: 2011105044@njau.edu.cn。

通信作者: 高峰, 教授, 主要从事动物营养调控与畜产品品质研究。Tel: (025) 84399007; E-mail: gaofeng0629@sina.com。

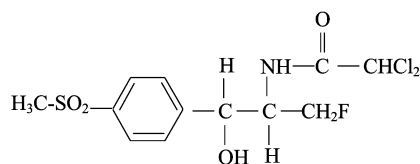


图1 氟苯尼考结构式

1.1.1 材料 6 周龄 BABL/C 雌性小鼠, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.1.2 主要试剂 含量 >98.0% 的氟苯尼考胺; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、卵清白蛋白 (OVA)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, TMB, Sigma-Aldrich 公司; 含量 >98.0% 的牛血清白蛋白 (BSA), Amresco 公司; DMF (*N,N*-二甲基甲酰胺)、戊二醛等其他试剂均为国产分析纯。

PBS 缓冲液 (pH 值 7.4) 包括 0.2 g KH_2PO_4 、2.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、0.2 g KCl、8.0 g NaCl、1 L 蒸馏水; CB 包被液 (pH 值 9.6) 包括 0.17 g Na_2CO_3 、0.28 g $NaHCO_3$ 、100 mL 去离子水; PBST 洗涤液包括含 0.05% Tween-20 的 PBS; 封闭液包括含 1% BSA 的 PBS; 底物显色 A 液包括 13.6 g CH_3COONa 、1.6 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 、0.3 mL 30% H_2O_2 、500 mL 蒸馏水; 底物显色 B 液包括 0.2 g EDTA- Na_2 、0.95 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 、50 mL 甘油、0.2 g TMB、500 mL 蒸馏水; 终止液: 取浓 H_2SO_4 27.62 mL 缓缓加入到 473 mL 的蒸馏水中, 混合即可, 在加入硫酸的过程中不要加得太快, 以免过热。

1.1.3 主要仪器 UV-2450 紫外-可见分光光度计 (岛津分析仪器公司); 酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 氟苯尼考人工抗原的合成 氟苯尼考人工抗原的制备依据赵朋玲等的方法^[15-16]: 将 14 mg BSA 溶于 4 mL 0.01 mol/L PBS (pH 值 7.4) 中, 磁力搅拌下逐滴加入 1 mL DMF (含 2 mg 氟苯尼考胺) 中, 待混匀后, 磁力搅拌下逐滴加入 50 μ L 25% 戊二醛于反应液中, 4 $^{\circ}C$ 下搅拌过夜, 反应液于 4 $^{\circ}C$ 、pH 值 7.4 的 PBS 中透析 72 h, 每 8 h 换液 1 次; 收集透析液中成分一半于 4 $^{\circ}C$ 下保存供检测用, 一半于 -20 $^{\circ}C$ 下保

存供免疫用,合成路线如图 2 所示。同法合成 FFA-OVA 包被原。

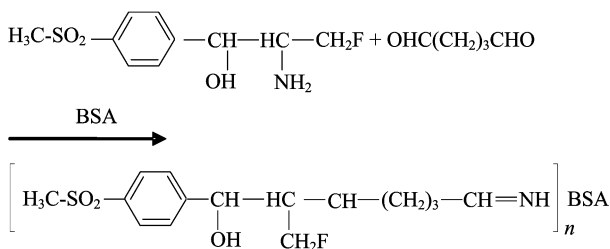


图2 氟苯尼考胺人工抗原合成路线

1.2.2 人工抗原的鉴定 紫外扫描法:用紫外分光光度计鉴定 FFA 与载体蛋白的偶联是否成功。用 PBS 精确配制 FFA、BSA 和 OVA 标准溶液,然后吸取一定量的 FFA-BSA 和 FFA-OVA 储备液,稀释适宜倍数后,在 200~400 nm 下分别测定其吸光度,根据反应前后紫外吸收光谱的变化情况判断偶联是否成功。

1.2.3 人工抗原结合比的测定 用紫外分光光度计确定氟苯尼考胺的最大吸收波长,然后在氟苯尼考胺最大吸收波长下测定人工抗原和载体蛋白的吸光度,按照如下公式^[17]计算 FFA-BSA 和 FFA-OVA 的结合比:结合比 = $(\varepsilon_{\text{偶联物}} - \varepsilon_{\text{载体蛋白}}) / \varepsilon_{\text{半抗原}}$,其中 ε 为摩尔吸光系数; $\varepsilon = D / (c \times b)$,其中 D 为吸光度, c 为浓度, b 为比色皿光径。

1.2.4 人工抗体的制备 免疫前先尾静脉取血,作阴性对照。用 FFA-BSA 免疫 6 周龄 BALB/C 小鼠 6 只,背部皮下多点注射,免疫剂量为 100 μg /只(即 0.2 mL/只)^[18]。首次免疫,取无菌 PBS 溶解的 FFA-BSA,与等体积的弗氏完全佐剂混合,漩涡混合仪上充分乳化;强免疫,弗氏佐剂改用弗氏不完全佐剂,其余同前^[19]。共免 5 次,每次间隔 2 周,每次免疫后第 10 天断尾采血,最后一次免疫后第 10 天眼眶采血,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜析出血清,3 000 r/min 下离心 10 min,取上清^[20~21],一部分直接于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存,一部分 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用,收集的抗血清用硫酸胺法进行纯化^[20]。

1.2.5 包被抗原浓度的选择 用棋盘滴定法确定最佳包被浓度:用包被缓冲液将包被抗原作系列稀释,浓度分别为 10.0、8.0、6.0、4.0、2.0、1.0、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$;用抗体稀释液将二免后抗血清作倍比稀释,浓度分别为 1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200。在 96 孔板上从左到右依次加入包被抗原,从上到下依次加入抗血清。按所建立的间接 ELISA 方法进行操作, D 值选取 1.0 左右,且以处在曲线平台下降的那一点包被浓度作为最佳抗原抗体稀释条件^[20]。

1.2.6 间接 ELISA 法测抗体效价 操作步骤:(1)抗原包被。将包被原用包被液稀释至最佳包被浓度。100 μL /孔加入到聚苯乙烯酶联检测板各孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h,洗涤 2 次,5 min/次,拍干。(2)封闭。加入封闭液 200 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 3 h,洗涤 3 次,拍干。(3)加待测样品。倍比稀释的五免抗血清 100 μL /孔,以正常小鼠阴性血清作对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,拍干。(4)加二抗。用封闭液将辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 稀释,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,拍干。(5)显色。加入 A、B 液各 80 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$

显色 15 min。(6)终止。加入终止液 80 μL /孔。(7)读数。在 450 nm 单波长下测定各孔的 D 值,以与阴性对照孔 D 值的比值(P/N)大于 2.1 为限,作为判断效价的临界点。

1.2.7 间接 ELISA 法测抗体灵敏性 用间接竞争 ELISA 法测定抗血清的特异性,采用本研究所确定的最佳包被浓度和抗体稀释浓度,将“间接 ELISA 方法”中的第三步替换为“分别加入系列稀释的 FF 标准品 50 μL /孔和最佳稀释倍数的抗血清 50 μL /孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,拍干”。

1.2.8 间接 ELISA 法测定抗体交叉反应率 用间接竞争 ELISA 法测抗体的交叉反应率。采用“1.2.6”节所确定的最佳包被浓度和抗体稀释度,将“间接竞争 ELISA 法”中的第三步替换为“分别加入系列稀释的氯霉素、甲砒霉素或喹乙醇标准品 50 μL /孔和最佳稀释倍数的抗血清 50 μL /孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,洗涤 3 次,拍干”。

2 结果与分析

2.1 紫外扫描结果鉴定

由图 3、图 4 可以看出,FFA-BSA 和 FFA-OVA 的紫外吸收光谱不同于 FFA、BSA 和 OVA 的紫外吸收光谱。FFA 在 266、273 nm 处有 2 个吸收峰,最大吸收峰在 266 nm 处;而 BSA、OVA 的最大吸收峰分别在 278、279 nm 处;与 FFA、BSA 和 OVA 相比,偶联物 FFA-BSA 和 FFA-OVA 的吸收曲线发生了变化,最大吸收峰分别为 274、270 nm,且在 FFA 和 BSA、OVA 的最大吸收范围内,说明半抗原与载体蛋白偶联成功,这与赵朋玲等的报道^[15]一致。

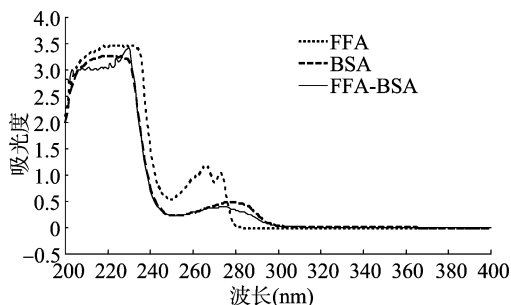


图3 FFA、BSA 和 FFA-BSA 的紫外扫描光谱图示

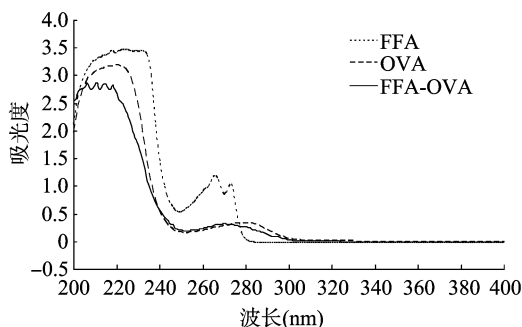


图4 FFA、OVA 和 FFA-OVA 的紫外扫描光谱图示

2.2 人工抗原结合比

结合 FFA、载体蛋白及人工抗原的紫外吸收数据计算出 FFA-BSA 和 FFA-OVA 的结合比,分别为 12:1 和 11:1。经研究发现,载体蛋白与连接的半抗原分子数量在 1:(5~25)^[22] 的范围内能获得良好的免疫效果。比例过低,

会因空间屏蔽作用阻碍抗原抗体的免疫反应而降低检测的灵敏度;比例过高,则会增加偶联物制备过程中的麻烦,且会降低免疫诱导质量^[20]。本试验合成的免疫原结合比为 12 : 1,正好在这个范围内,说明合成的免疫原有较好的免疫效果。

2.3 最佳包被浓度的确定

选择 *D* 值随包被浓度降低而突然降低且在 1.0 左右的那一点的包被浓度,由表 1 可知,最佳包被浓度为 2 μg/mL。

表 1 棋盘滴定法确定的最佳包被抗原浓度

包被浓度 (μg/mL)	不同血清稀释倍数的 <i>D</i> 值						
	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200
10.0	2.674	2.308	1.602	0.945	0.535	0.339	0.201
8.0	2.663	2.228	1.533	0.917	0.520	0.307	0.193
6.0	2.651	2.065	1.410	0.857	0.463	0.303	0.183
4.0	2.556	1.939	1.267	0.785	0.469	0.269	0.172
2.0	2.408	1.785	1.097	0.615	0.302	0.205	0.136
1.0	2.103	1.627	0.995	0.520	0.293	0.189	0.104
0.5	1.204	1.003	0.856	0.415	0.206	0.117	0.099

2.4 血清效价的测定

由表 2 可知,经过多次免疫后,6 只小鼠的效价均在 32 000 以上,说明注射的抗原均达到了良好的免疫效果,也验证了人工抗原偶联成功。

表 2 间接 ELISA 测定的小鼠血清效价

小鼠序号	不同血清稀释倍数的 <i>D</i> 值					
	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000
1	1.705	1.486	1.099	0.578	0.317	0.133
2	1.702	1.595	1.208	0.785	0.303	0.135
3	1.699	1.389	1.104	0.682	0.291	0.108
4	1.710	1.439	1.211	0.786	0.327	0.145
5	1.696	1.397	1.040	0.779	0.292	0.121
6	1.693	1.289	0.911	0.581	0.281	0.117
阴	0.119	0.108	0.099	0.085	0.077	0.073
空	0.050	0.055	0.053	0.052	0.058	0.061

2.5 抗体敏感性测定

图 5 为氟苯尼考对抗体的抑制率标准曲线。该曲线呈“S”形,与 Luo 等的报道^[2]相似。曲线中间线性部分的线性回归方程为 $y = -0.3728x + 1.0843$, $r^2 = 0.9944$ 。根据回归方程计算出半抑制率(IC_{50} ,是抑制率为 50%时所对应的药物浓度, IC_{50} 越低,说明抗体的特异性越强)为 36.9 ng/mL。由图 5 可知,该抗体与氟苯尼考表现出很好的亲和性。

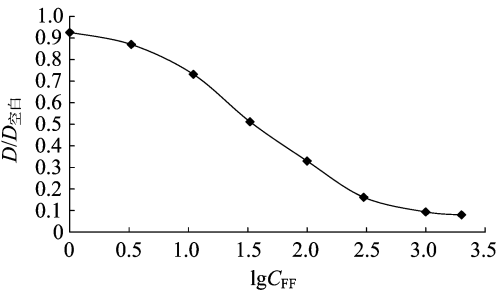


图5 氟苯尼考对抗体的抑制率曲线

2.6 抗体交叉反应率的测定

由表 3 可知,制备的抗体与结构相似的甲矾霉素有较小

的交叉反应,与氯霉素、结构不相似的喹乙醇几乎无交叉反应。

表 3 氟苯尼考多克隆抗体交叉反应测定结果

化合物	半数抑制率浓度 (ng/mL)	交叉反应性 (%)
氟苯尼考	36.9	100.0
氯霉素	>36 900.0	<0.1
甲矾霉素	7 772.0	0.3
喹乙醇	>36 900.0	<0.1

3 结论与讨论

3.1 氟苯尼考人工抗原的制备和鉴定

免疫识别要求免疫原至少要有 2 个识别位点,因此免疫原分子必须相当大,所以小分子物质(分子量 < 2 500^[23])不能产生免疫应答^[20]。氟苯尼考分子量为 358.22,属于小分子物质,必须与大分子物质偶联才能使动物机体产生免疫反应。由于氟苯尼考在结构上既无羧基又无氨基,必须先进行结构改造,才能与蛋白偶联。但改造时须尽可能保留其特征结构,并引入合适的间隔臂和与载体蛋白偶联的活性基团。常用的改造方法有^[15]:一是利用 FF 分子上所带的羟基合成含 CO—NH 键的抗原;二是用强碱水解氟苯尼考分子为氟苯尼考胺,再与含醛基的物质、载体蛋白的氨基以共价键相连。本试验选用戊二醛一步法,氟苯尼考胺为半抗原合成人工抗原,操作简单、易行。载体蛋白的选择也是抗原合成的重要因素,本试验选择 BSA 作为免疫原的载体,OVA 作包被原的载体,它们的亲缘性较远,可以减少和避免交叉反应,且都价廉易得^[24]。

用于人工抗原的鉴定方法有很多,包括紫外光谱法^[18]、红外光谱法^[24]、SDS—PAGE 电泳^[21]、基质辅助激光解质质谱法^[21]及免疫鉴定分析^[15,25]等。其中,紫外光谱法最简便、快速且不会消耗样品^[20],所以常被使用。本研究用紫外光谱法对人工抗原、半抗原与载体蛋白紫外吸收光谱特征进行鉴定,其吸收峰出现了平移,说明人工抗原合成成功;并根据吸光度计算出其分子中半抗原与载体的分子结合比率,分别为 12 : 1、11 : 1。另外,多克隆抗体的成功制备也验证了人工抗原的合成成功。

3.2 FF 多克隆抗体的制备及鉴定

人工制备的抗体可分为单克隆抗体和多克隆抗体。前者由于生产成本低、试验周期长、技术和条件要求苛刻,所以本研究选择制备多克隆抗体。多克隆抗体存在于免疫动物的血清中,一般多用兔子作为免疫动物,这样可以获得足够的血清。由于本研究仅需少量抗体,且小鼠饲养方便、成本低、操作方便,少量的免疫原即可产生免疫应答反应,所以本研究选用 6 周龄清洁级 BALB/C 小鼠为免疫动物^[26]。

免疫剂量和免疫方式对免疫效果和抗体效价具有较大的影响,一般认为 1 kg 体质量 1 次免疫 1 mg 左右的半抗原—蛋白质免疫原^[20],免疫剂量过低不会发生免疫反应,而过高的免疫原又会产生免疫耐受。本试验选用 100 μg/(只·次)的注射剂量,该剂量在 Erhard 等认为的最佳免疫剂量范围内^[27]。免疫方式的选择决定了抗原的吸收、分布和代谢速度,常用的免疫方式有背部皮下多点免疫、腹腔、皮内、肌肉、静脉、脾脏和淋巴结免疫等。一般认为,小分子物质合成的人

工抗原适合背部皮下多点免疫^[22]。

本试验对制备的抗血清进行纯化、分析,获得了氟苯尼考的多克隆抗体,结果显示该抗体有较高的特异性和灵敏性,IC₅₀值达到 36.9 ng/mL,能够满足建立快速检测试纸条的要求^[28-29],可用于下一步试验。

本试验将氟苯尼考的改造体氟苯尼考胺与 BSA 和 OVA 合成人工抗原,经紫外扫描鉴定,证明人工抗原合成成功。用其制备的多克隆抗体,测得 IC₅₀ 为 36.9 ng/mL,与氟苯尼考有良好的亲和性和特异性,为进一步研究动物源食品中氟苯尼考残留快速检测技术奠定基础。

参考文献:

- [1] Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(5): 519–542.
- [2] Luo P J, Jiang H Y, Wang Z H. Simultaneous determination of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in swine muscle tissue by a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of AOAC International, 2009, 92(3): 981–988.
- [3] 陈晓慧, 刘明春, 焦阳. 氟苯尼考的研究新进展及其应用[J]. 现代畜牧兽医, 2006(10): 51–54.
- [4] 李莹莹, 宋永青, 赵榕, 等. 液质联用检测鱼肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺的残留量[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 219–222.
- [5] 谢恺舟, 徐东, 陈书琴, 等. 高效液相色谱荧光检测法同时检测鸡肉中甲砒霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺残留[J]. 分析试验室, 2011, 30(7): 31–35.
- [6] Wrzesinski C L, Crouch L S, Endris R. determination of florfenicol amine in channel catfish muscle by liquid chromatography[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(3): 515–520.
- [7] 孙丰云, 张素霞, 沈建忠, 等. 虾肉中氯霉素甲砒霉素氟苯尼考及氟苯尼考胺残留气相色谱-微电子捕获检测法[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(10): 66–68.
- [8] 贺利民, 曾振灵, 黄显会, 等. 气相色谱-质谱联用法测定猪肉组织中氟苯尼考残留[J]. 华南农业大学学报, 2005, 26(3): 100–102.
- [9] 张凤清, 王岩松, 范世华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉组织中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 248–251.
- [10] Zhang S X, Liu Z W, Guo X, et al. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008, 875(2): 399–404.
- [11] Luo P J, Jiang W X, Chen X, et al. Technical note: development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of florfenicol and thiamphenicol in swine feed[J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(11): 3612–3616.

- [12] Fodey T L, George S E, Traynor I M, et al. Approaches for the simultaneous detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine using immunochemical techniques[J]. Journal of Immunological Methods, 2013, 393(1/2): 30–37.
- [13] 孔繁德, 黄印尧, 赖清金. 免疫胶体金技术及其发展前景[J]. 福建畜牧兽医, 2002, 24(增刊): 42–43, 45.
- [14] Shi C G, Zhao S Q, Zhang K, et al. Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(11): 1392–1397.
- [15] 赵朋玲, 郑海涛, 姜盼盼, 等. 两种方法制备氟苯尼考人工抗原及其鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 225–230.
- [16] 赵津子. 氟苯尼考胺 IgY 抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [17] Sheng J W, He M, Shi H C, et al. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 572(2): 309–315.
- [18] Liu J, Zhang H C, Zhang D S, et al. Production of the monoclonal antibody against Sudan 2 for immunoassay of Sudan dyes in egg[J]. Analytical Biochemistry, 2012, 423(2): 246–252.
- [19] 侯吉波, 丁再棣, 何家惠. 介绍一种简便的抗原乳化方法[J]. 上海免疫学杂志, 1990(4): 216.
- [20] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
- [21] 王莹, 郑浩, 何成华, 等. 伏马菌素 B1 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国农业科学, 2011, 44(20): 4302–4308.
- [22] 宋春美. 喹乙醇单克隆抗体的制备及其免疫学快速检测方法的建立[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2009.
- [23] 张明洲, 胡华军, 杨岭, 等. 苏丹红 I 号多克隆抗体的制备与特异性鉴定[J]. 中国计量学院学报, 2008, 19(2): 170–173, 182.
- [24] 朱学加, 陈金兰, 何计国. 喹乙醇人工抗原的合成及鉴定[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 129–133.
- [25] 赵启法, 张改平, 职爱民, 等. 头孢氨苄人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 西北农业学报, 2012, 21(7): 20–24, 90.
- [26] 胡珩. 氟喹诺酮多组分残留检测试纸条的研制[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [27] Erhard M H, Ozpinar H, Bilal T, et al. The humoral immune response and the productivity of laying hens kept on the ground or in cages[J]. Alternatives to Laboratory Animals, 2000, 28(5): 699–705.
- [28] Xu C L, Chu X G, Peng C F, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diethylstilbesterol residues in chicken and liver tissues[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(10): 1056–1064.
- [29] Xu C L, Wang H T, Peng C F, et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of diethylstilbesterol residues[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(12): 1390–1394.