

杨兴东,胡晓飞,王方雨,等. 己烯雌酚人工抗原的合成及抗血清的制备[J]. 江苏农业科学,2017,45(8):149-152.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.041

己烯雌酚人工抗原的合成及抗血清的制备

杨兴东^{1,2}, 胡晓飞², 王方雨², 曾宪垠³

(1. 周口师范学院生命科学与农学院, 河南周口 466001; 2. 河南省农业科学院免疫学重点实验室, 河南郑州 450002;

3. 四川农业大学生命科学学院, 四川雅安 625014)

摘要:由己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)经过一系列化学反应,合成含有1个羟基活性基团的半抗原己烯雌酚-单羧基丙基醚(DES-MCPE);应用活泼酯法,使DES-MCPE与牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)偶联,合成人工免疫抗原DES-BSA和包被抗原DES-OVA,采用紫外分光光度法(UV)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定,初步判定偶联成功。用DES-BSA以60 μg/只的剂量免疫3只BALB/c小鼠,4次免疫后,采集血清,使用间接ELISA和间接竞争ELISA分别测定抗血清的效价与抑制,3只小鼠的效价均可达到 1×10^4 以上,其中2号小鼠的半抑制率(IC₅₀)为18.221 μg/L,表明已获得灵敏、特异、高效价的抗血清。

关键词:己烯雌酚;完全抗原;人工合成;抗血清;ELISA;高效价;灵敏

中图分类号: S852.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)08-0149-03

己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)是一种人工合成的非甾体雌激素,具有促进动物生长、提高瘦肉率的作用,曾经作为促生长剂在畜禽生产中得到普遍应用。但DES对人类有很强的致畸、致癌等毒副作用^[1-3],我国及大多数国家均明确规定禁止在畜牧养殖中使用DES。为降低动物生产成本,不规范使用己烯雌酚的现象仍然存在。传统的理化检测技术虽然能够监测动物源性食品中的DES残留,但其存在用时长、费用多、程序繁琐等缺陷,因此急需发展一种迅速、简便、敏感、精确、价廉的分析方法^[4]。本试验旨在合成DES人工抗原和制备抗DES抗血清,为DES残留血清学检测的建立打下基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和溶液

DES、4-溴丁酸乙酯, Sigma 产品; 羟琥珀酰亚胺(NHS)和N,N-二环己基碳二亚胺(DCC), Fluka 公司; 牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA), 弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA), Pierce 产品; 羊抗鼠酶标二抗(GaMlgG-HRP), 华美生物工程有限公司; 二甲基亚砜、乙酸乙酯、二甲基甲酰胺均为AR级。

ELISA相关试剂配制:(1)洗液(PBST):含0.05%的Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH值为7.4); (2)间接ELISA和间接竞争ELISA所用的稀释液、封闭液均为含50 mL/L猪血清的PBST; (3)包被液(CBS)为0.05 mol/L pH值9.6的碳酸盐缓冲液; (4)显色液为四甲基联苯胺(TMB)的醋酸-柠檬酸缓冲液; (5)终止液为2 mol/L

的H₂SO₄溶液。

1.2 主要仪器设备

U-3000紫外扫描仪(UV), 日本岛津公司; 凝胶成像系统及分析软件, Syngene 公司; JM-250电泳仪, 大连捷迈科贸有限公司; Bio-Rad 550型酶标仪, 美国Bio-Rad公司; 超净工作台, 美国Forma Scientific公司; 93-3定时恒温双向磁力搅拌器, 上海亚荣生化仪器厂; 3K-18高速冷冻离心机, 德国SIGMA公司; HI9321酸度计, 美国HANNA公司; Jouan-RC1010z真空浓缩仪, 法国Jouan公司; AE260电子天平, 德国METTLER公司。

1.3 实验动物

SPF级6~8周龄的雌性BALB/c小白鼠, 购自郑州大学医学院实验动物中心, 由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室饲养。

1.4 方法

1.4.1 DES人工抗原的合成

1.4.1.1 己烯雌酚-单羧基丙基醚(DES-MCPE)的合成
(1)精确称量54 mg DES溶于2 mL无水二甲基亚砜(DMSO), 加入27.5 mg无水K₂CO₃, 在避光条件下, 室温搅拌反应1.5 h; (2)加入4-溴丁酸乙酯(C₆H₁₁BrO₂)17 mg, 室温, 避光, 搅拌反应8 h; (3)反应产物转移到10 mL预冷pH值2.0的稀盐酸溶液中, 加入醋酸乙酯(C₄H₈O₂)进行萃取, 双蒸水冲洗、放入真空浓缩仪中, 抽提有机溶剂; (4)抽提后的产物加入适量的甲醇(CH₃OH)溶液进行溶解, 再加入2 mol/L氢氧化钠溶液, 全部溶解后, 逐滴加入适量的HCl溶液, 使溶液pH值在2~4之间, 重复上述分离步骤, C₄H₈O₂萃取, 双蒸水冲洗、真空干燥, 得到目标产物(DES-MCPE)^[5]。

1.4.1.2 DES-BSA免疫原、DES-OVA包被原的制备

(1)称取DE-MCPE 42 mg溶于2 mL二甲基亚砜(DMSO), 将25 mg DCC溶解在0.6 mL无水二甲基甲酰胺, 加入15 mg NHS, 暗处、室温下搅拌反应4 h。(2)2 900 r/min离心5 min, 弃去沉淀, 收集上清。(3)精确称量BSA 60 mg溶于

收稿日期:2016-02-13

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2014BAD13B05);河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:14B230011)。

作者简介:杨兴东(1978—),男,河南商人,博士,讲师,主要从事食品安全检测研究。E-mail: zzyangxd@163.com。

通信作者:王方雨,博士,副研究员,主要从事食品安全检测研究。

E-mail:13938559288@126.com。

2 mL 的 pH 值 8.0 的 PBS 中,冰浴,逐滴加入 1 mL 无水二甲基甲酰胺。(4)将上清液缓慢逐滴滴加到 BSA 溶液中,4 ℃ 搅拌 8 h。(5)将反应产物加入透析袋中,透析袋放入盛有 1 000 mL PBS 缓冲液的烧杯中,将烧杯转移到 4 ℃ 冷冻室开始透析,透析液需每天更换 3 次,持续透析 3 d。(6)透析完成后,透析袋内溶液移入离心管,离心 5 min,收集上清液,用 1 mL PE 管分装,-20 ℃ 存放待用。包被原 DES-OVA 的制备过程与 DES-BSA 相同,OVA 的剂量为 70 mg^[6]。

1.4.2 DES 人工抗原的鉴定

1.4.2.1 UV 鉴定 使用核酸蛋白检测仪 DES-BSA 溶液的质量浓度,用 PBS 配制 BSA 溶液使其浓度与 DES-BSA 溶液的浓度相同,用二甲基甲酰胺(DMF)与 PBS 体积比为 4:6 的混液配制 DES 标准溶液,在波长 220~350 nm 之间,用紫外吸收法分别测定上述溶液的特征峰,通过观察吸收峰的特征变动,判定偶联成功与否,依据 Yang 等报道的方法^[7],推算出 DES-MCPE 分别与 BSA、OVA 的分子偶联比率。

1.4.2.2 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 电泳溶液的配制依照 Guo 等的报道^[8]来进行:(1)浓缩胶 $\omega = 5\%$;分离胶 $\omega = 12\%$;浓缩胶电压 65 V;分离胶电压 100 V;(2)加入样品 20 μL ,其中含免疫原 3 μg ;(3)考马斯亮蓝染色 7~8 h;(4)在脱色液中脱色 6~7 h;(5)可以通过测定物的分子质量的大小、条带位点的变化能够判定结合与否;(6)利用紫外凝胶成像系统分析软件,推算 DES-MCPE 与 BSA 的分子偶联比^[9]。

1.4.3 DES 多抗血清的制备 (1)用人工免疫原 DES-BSA 以 60 μg /只的剂量,背部多点皮下注射的免疫方式来免疫 3 只实验小鼠;(2)第 1 次免疫,450 μL FCA 和 450 μL DES-BSA 的无菌 PBS 溶液进行混合,利用匀浆机乳化 5~10 min;(3)28 d 后加强免疫,用 450 μL DES-BSA 的无菌 PBS 溶液与 450 μL FIA 混合并乳化,注射剂量与第 1 次免疫剂量相同,总共免疫 4 次,每次间隔时间为 21 d;(4)第 4 免 10 d 后剪断免疫小鼠的尾梢,吸取 10 μL 血液放入装有 990 μL 无菌 PBS 的 1 mL PE 管中,在振荡器上振荡使之充分混合均匀,离心 5 min,收集上清液,于 4℃ 存放待用。

1.4.4 DES 多抗血清的鉴定

1.4.4.1 效价测定 采用间接 ELISA 测定 DES 抗血清效价^[10],其步骤如下:第 1 步,以 DES-OVA 为包被抗原(2 $\mu\text{g}/\text{L}$),50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,进行包板,37 ℃ 温育 2 h,PBST 洗板 4 次(每次间隔 3 min),下同;第 2 步,37 ℃,5% 的猪血清以 220 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的剂量封闭 60 min,洗板;第 3 步:稀释 100 倍的 DES 抗血清以 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的剂量加入第 1 孔,然后利用 5% 的猪血清进行倍比稀释,同时设阴性对照(negative control,NC)和空白对照(blank control,BC),37 ℃ 温育 15 min,洗板;第 4 步:加入 GaMIgG-HRP [V(GaMIgG-HRP):V(封闭液) = 1:1 000],50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 ℃ 温育 30 min,洗板;第 5 步:各孔加入 TMB(四甲基联苯胺)的 $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 缓冲液 50 μL ,室温条件下静置 2~6 min;第 6 步:各孔加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μL ,使反应结束,利用酶标仪进行测定;第 7 步,结果判断,以待测孔 $D_{450\text{nm}} \geq \text{NC } D_{450\text{nm}}$ 的 2.1 倍($P/N \geq 2.1$),判为阳性。

1.4.4.2 敏感性鉴定 间接竞争 ELISA (ci-ELISA) 方法^[11]测定抗血清对 DES 的半数抑制质量浓度(IC_{50}),以 IC_{50}

判定敏感度,操作步骤与间接 ELISA 类似,区别在于第 3 步分别添加 $D_{450\text{nm}}$ 值为 1.0 的 3 只小鼠血清 50 μL 和不同质量浓度的抑制剂(DES 溶液)50 μL 。

1.4.4.3 特异性测定 交叉反应(CR)试验鉴定其特异性。选用己烯雌酚(DES)、己烷雌酚(HEX)、双烯雌酚(DIEN)和雌二醇(E_2)等作为竞争物,用 ci-ELISA 测定各竞争物的 IC_{50} ,交叉反应率(CR%)是以抗血清对 DES 的 IC_{50} 与各竞争物的 IC_{50} 之比的百分数。

2 结果与分析

2.1 人工抗原鉴定结果

2.1.1 UV 鉴定结果 DES-BSA 的吸收峰向右稍有偏移,DES 的吸收峰在 240~245 nm 处,BSA 的吸收峰在 278~280 nm 处(图 1),证明 DES 和 BSA 已发生偶联。推算出 DES-MCPE 与 BSA、OVA 的分子偶联比分别为 1:12.8、1:11.5。

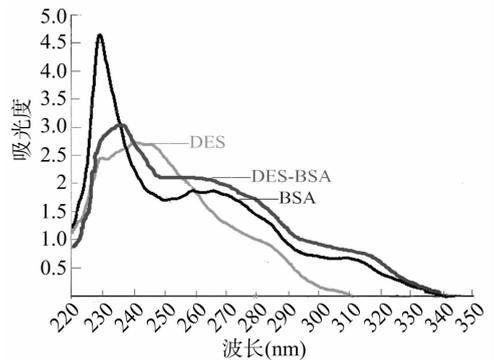


图1 BSA、DES和DES-BSA的紫外扫描光谱

2.1.2 SDS-PAGE 鉴定结果 人工合成的 DES-BSA 的显色条带位于偶联物之后,其泳动速度小于 DES(图 2),DES 分子质量的大小与样品在 SDS-PAGE 中迁移距离成反比,结果分析表明,DES-BSA 的分子量比 BSA 的大,证明 BSA 与 DES 成功偶联;应用紫外凝胶成像系统分析软件推算出 DES-BSA 的分子量为 7.039×10^4 ,BSA 的分子量为 6.62×10^4 ,BSA 与 DES 的分子结合比约为 1:12.8,与 UV 鉴定结果基本一致。

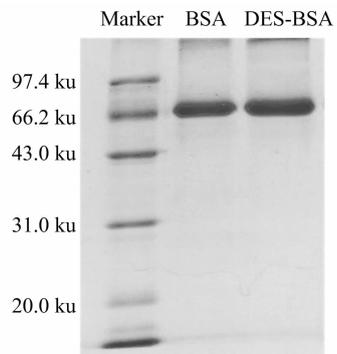


图2 BSA、DES-BSA的SDS-PAGE结果

2.2 DES pAb 的鉴定结果

2.2.1 间接 ELISA 检测结果 表 1 显示,免疫的 3 只 BALB/c 小鼠的多抗血清的效价均达到 1.0×10^4 以上,证明 DES 多克隆抗体(pAb)滴度高,DES-BSA 免疫原性良好。

表1 DES-BSA 免疫小鼠多抗效价测定

阳性血清 稀释倍数	多抗效价		
	1号小鼠血清	2号小鼠血清	3号小鼠血清
200	2.796	3.138	1.122
400	2.574	2.983	0.816
800	1.427	2.478	0.494
1 600	0.89	1.773	0.324
3 200	0.52	1.115	0.215
6 400	0.297	0.863	0.184
128 00	0.187	0.603	0.096
阴性	0.086	0.084	0.079
空白	0.063	0.054	0.055

表2 DES 多抗血清的抑制效价

免疫小鼠序号	不同 DES 标准品浓度多抗血清抑制效价									
	320 $\mu\text{g/L}$	160 $\mu\text{g/L}$	80 $\mu\text{g/L}$	40 $\mu\text{g/L}$	20 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	2.5 $\mu\text{g/L}$	0	
1	0.073	0.131	0.238	0.342	0.496	0.684	0.799	0.890	1.009	
2	0.054	0.120	0.201	0.329	0.474	0.681	0.779	0.820	1.019	
3	0.140	0.178	0.281	0.401	0.549	0.698	0.785	0.873	1.001	

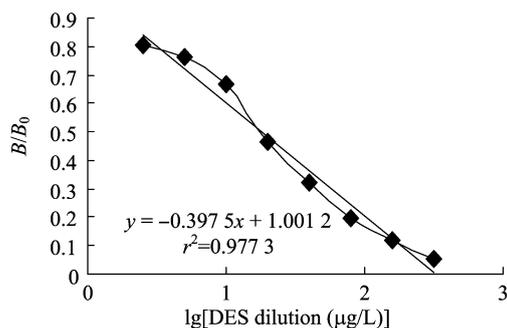
图3 阻断 ELISA 检测 2 号小鼠 DES IC_{50}

表3 DES pAb 与 DES 结构类似物的交叉反应

化合物	半数抑制质量浓度 IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	交叉反应率 (%)
己烯雌酚	18.221	100.00
己烷雌酚	225.200	8.09
双烯雌酚	501.600	3.63
甲孕酮	$>2.00 \times 10^4$	<0.1
雌二醇	$>2.00 \times 10^4$	<0.1
双酚 A	$>2.00 \times 10^4$	<0.1
雌三醇	$>2.00 \times 10^4$	<0.1

3 讨论

3.1 DES 人工抗原的制备

依据 DES 免疫学测定技术的报道,归纳活化 DES 重要的手段有 2 种:一种是改造己烯雌酚中的酚羟基产生醚键;另一种是改造 DES 中的酚羟基形成酯键,对 DES 分子含有 2 个对称结构的酚羟基进行衍生反应,对其可直接与琥珀酸酐衍生使之生成具有交联功能基团的化合物,然后再与载体交联。要对其中一个酚羟基进行化学改造,必须从反应物的量上加以严格控制,按一定比例反应后,保证生成的产物是 DES-HS。我们按照此法对 DES 进行多次改造,但结果没有新的产物产生。Liu 等报道动物体内酯酶使机体内的酯键处于不稳定状态,而且免疫原性不理想^[12]。本研究为了避免这一现象的产生,选取后一种连接方式。

3.2 DES 人工抗原的鉴定

2.2.2 敏感性鉴定结果 3 只免疫小鼠的抗血清都有抑制生成(表 2),其中抗血清抑制效果最优的是 2 号小鼠(图 3),以 2 号小鼠抗血清的抑制浓度的对数值为横坐标,其对应的 B/B_0 值为纵坐标进行绘图,曲线回归分析显示两者存在良好的线性关系,其线性回归方程为 $y = -0.3975x + 1.0012$, $r^2 = 0.9773$ 。据此回归方程能够计算出对 DES 抗血清的 IC_{50} 为 $18.221 \mu\text{g/L}$,证明所获得的 DES 抗血清的敏感性较高。

2.2.3 特异性鉴定结果 DES 抗血清与己烷雌酚、双烯雌酚的交叉反应率分别为 8.09%、3.63%,与其类似物无交叉反应(表 3)。证明 DES 多抗血清拥有较好的选择性。

核磁共振碳谱、IR、标记抗原示踪法^[13]、UV^[14]、聚丙烯酰胺凝胶电泳等是检测小分子抗原经常使用的方法,前 2 种方法能够很好地测出被检测物质的化学式,但是操作者需要拥有辨析图谱的能力和相当程度的实际动手经历,而且检测成本高昂,第 3 种方法要求对小分子作标记,还要求检测合成抗原的放射强弱,操作过程步骤繁琐、所需时间长。使用后 2 种方法鉴定本试验合成的抗原,结果显示,DES 与 BSA 已经发生偶联,断定两者是否发生偶联的关键是合成的 DES-BSA 抗原免疫 BALB/c 小鼠后,是不是生成了针对 DES 的抗体^[15]。本试验测定的 3 只 BALB/c 小鼠的多克隆抗体的效价都在 1×10^4 以上,都对 DES 有抑制,最佳的 IC_{50} 为 $18.221 \mu\text{g/L}$,结果表明,本研究合成的抗原可以激发机体产生高亲和力的特异性抗体,充分证明该合成物是有效的。

参考文献:

- [1] Palmer J, Boggs D, Hatch E, et al. Prenatal DES exposure in relation to breast size[J]. Cancer Causes & Control:CCC, 2013, 24(9):1757-1761.
- [2] Tournaire M, Devouche E, Epelboin S, et al. Diethylstilbestrol exposure: evaluation of the doses received in France[J]. European Journal of Epidemiology, 2012, 27(4):315-316, 318.
- [3] Nakajima T, Iguchi T, Sato T. Involvement of activin signaling in abnormalities of mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol[J]. Cell and Tissue Research, 2011, 344(3):527-538.
- [4] Xiong P, Gan N, Cui H, et al. Incubation-free electrochemical immunoassay for diethylstilbestrol in milk using gold nanoparticle-antibody conjugates for signal amplification[J]. Microchimica Acta, 2014, 181(3/4):453-462.
- [5] 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 diethylstilbestrol residues in chicken and liver tissues[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(10):1056-1064.
- [6] Suzuki E, Nakagomi M, Hashimoto M, et al. Preparation of specific antisera to 15 α -hydroxyestrogens[J]. Steroids, 1999, 64(8):551-557.
- [7] 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, 1998:252-258.

司振书,张海涛,邵丹,等.肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(8):152-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.042

肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定

司振书¹,张海涛²,邵丹¹,秦飞燕¹

(1.聊城大学农学院,山东聊城 252000; 2.山东省聊城市东昌府区畜牧局,山东聊城 252000)

摘要:2015年6月中旬,山东省莘县、高唐等地多个养殖场3日龄肉杂鸡出现张口、伸颈、呼吸困难等症状,剖检呼吸道无明显病变,心脏、肝脏周围及皮下有大量淡黄色胶冻样渗出物,肝脏有大量点状坏死,为确定病原,对发病鸡的喉拭子进行了流感抗原性检测;对病鸡的肺脏进行了病毒分离培养;对其肝脏、心脏进行了细菌的分离培养、生化鉴定及药敏试验。结果表明,肉杂鸡发病由金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯菌的混合感染所致,针对无禽流感病毒和新城疫病毒的感染,采取了敏感药物治疗、消毒、加强饲养管理等综合措施,7 d后,发病情况逐渐好转,鸡群15日龄时趋于稳定。

关键词:肉杂鸡;肺炎克雷伯菌;金黄色葡萄球菌;分离鉴定;耐药菌株

中图分类号:S858.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)08-0152-02

鲁西小型肉杂鸡是用快大型白羽肉鸡的父母代父系公鸡作父本,褐壳商品蛋鸡作母本杂交而来,具有生长速度快、饲料报酬高、饲养周期短、料肉比低、肉质嫩、易加工、易成熟等特点,是制作脱骨扒鸡的最理想原料,在山东聊城各县(区)均具有较大养殖规模。2015年6月中旬,山东省莘县、高唐等地多个肉杂鸡养殖场相继发生同样疾病,3日龄小肉鸡开始出现张口、伸颈、呼吸困难,生长发育受阻,剖检呼吸道无明显病变,心脏、肝脏周围及皮下有大量的淡黄色胶冻样渗出物,肝脏有大量点状坏死。通过对鸡苗来源与去向等调查排除了鸡苗质量问题。采取病料进行细菌的分离培养,经鉴定分离到1株肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和1株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),且肺炎克雷伯菌分离株对多种药物具有耐药性。

1 材料与与方法

收稿日期:2016-02-15

基金项目:山东省农业良种工程重点课题(编号:25114426);聊城大学博士启动基金(编号:318051310);聊城大学大学生科技文化创新项目(编号:SF2014214)。

作者简介:司振书(1971—),女,山东冠县人,博士,副教授,研究方向为预防兽医学。E-mail:dckszs@163.com。

1.1 材料与设备

营养琼脂平板、高盐甘露醇琼脂平板、麦康凯琼脂平板由聊城大学动物预防兽医实验室制备。禽流感病毒(通用)抗原快速检测卡,购于深圳真瑞生物科技有限公司;XK型自动细菌鉴定仪、肠杆菌鉴定试剂盒、葡萄球菌鉴定试剂盒等由山东鑫科生物科技有限公司提供;各种药敏纸片,购于浙江杭州天和微生物试剂有限公司。

1.2 病料的采取

进行无菌操作,取发病肉鸡的喉拭子、肺脏、肝脏、心脏。

1.3 禽流感抗原检测

将喉拭子立即用禽流感病毒抗原快速检测卡进行检测,操作方法按说明书进行。

1.4 病毒的分离培养与鉴定

进行无菌操作,取少量肺脏样品,放入灭菌的研磨器,加含双抗的PBS研磨成10%~20%的悬液。4℃12000 r/min离心10 min,取上清,接种于4枚10日龄SPF鸡胚尿囊腔,0.2 mL/胚,每12 h照胚1次,弃去24 h内死亡胚,及时取出24~72 h死胚,于4℃冰箱过夜,72 h未死亡的全部取出置于冰箱内冻死,无菌收取尿囊液。用1%的鸡红细胞测定尿囊液有无血凝性;若无血凝性,则可排除新城疫病毒、禽流感病毒的感染;若有,则通过血凝抑制试验进一步进行鉴定。

[8]郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999:56-60.

[9]Kamps-Holtzapfel C, Carlin R, Sheffield C, et al. Analysis of hapten-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis[J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 164(2):245-253.

[10]Liu X, Eichenberger M, Fujioka Y, et al. Improved detection sensitivity and selectivity attained by open-sandwich selection of an anti-estradiol antibody[J]. Analytical Sciences, 2012, 28(9):861-867.

[11]Tolra F, Reig M. Analytical tools for assessing the chemical safety of meat and poultry[M]//Springer briefs in food, health, and nutrition.

New York:Springer,2012:61-67.

[12]刘雅红,单国强,康彦龙.己烯雌酚人工抗原的合成研究[J].中国兽医科技,2003,33(10):43-46.

[13]Pallardy M, Alberici G, Goodman A, et al. Antibody recognition of substituted ammonium ions. Modulation by the counterion[J]. Journal of Immunological Methods, 1987, 99(2):179-183.

[14]McAdam D P, Hill A S, Beasley H L, et al. Mono- and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion. 1. Approaches to hapten-protein conjugation[J]. J Agri Food Chem, 1992, 40(8):1466-1470.

[15]沈关心,周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉:湖北科学技术出版社,1998:17-18.