

范素菊,李嘉,李森,等. 金刚烷胺单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):220-223,232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.051

金刚烷胺单克隆抗体的制备和鉴定

范素菊^{1,2}, 李嘉¹, 李森¹, 杨兴东²

(1. 周口职业技术学院农牧工程学院, 河南周口 466000; 2. 周口师范学院食品药品检验检测中心, 河南周口 466001)

摘要:为制备金刚烷胺(AMD)的单克隆抗体(mAb),改造AMD的半抗原,采用EDC/NHS法合成人工免疫原AMD-BSA和检测抗原AMD-OVA,经紫外扫描和凝胶电泳进行鉴定,AMD与载体蛋白[牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵白蛋白(OVA)]成功偶联;用被免疫原(AMD-BSA)免疫BALB/c小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合,获得AMD杂交瘤细胞株,腹腔注射小鼠后,得到抗AMD的mAb。小鼠免疫后的多抗血清的效价均在 6.4×10^3 以上,所制得的杂交瘤细胞上清液的效价为 $3.6 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^3$,2D5细胞株的腹水效价为 5.12×10^5 ,对AMD的 IC_{50} 值为 $1.02 \mu\text{g/L}$,除与金刚乙胺的交叉反应率为9.82%,与其他结构类似物无交叉反应性。表明获得了高价、敏感和特异的抗AMD的单克隆抗体,为进一步的免疫学快速检测提供了技术支持。

关键词:金刚烷胺;免疫原;单克隆抗体;ELISA;抗体制备;抗体鉴定

中图分类号: S852.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0220-04

金刚烷胺(amantadine, AMD)是一种稳定、无色、结晶的胺,具有特殊的对称性结构。由于其具有干扰M2流感病毒蛋白合成和抗胆碱的作用^[1],临床上用作抗帕金森病毒和抗病毒药物^[2-3];在动物饲养中,AMD主要用于治疗和预防禽流感^[4-5]和猪的传染性胃肠炎^[4-5]。但是,AMD的过度使用会对人类和环境产生不利的生态后果。首先,它的广泛使用可以增加细菌耐药菌株的发生^[6-8]。其次,AMD的残留物可能通过食物链进入人体。AMD在人体内蓄积6周以上可以引起恶心、头晕、失眠、心慌等影响^[9]。事实上,美国食品和药物管理局已经禁止在牲畜中使用AMD;2005年,中国原农业部(公告号:560)禁止AMD作为家禽的抗病毒兽药。然而,由于其低廉的价格和可用性,家禽业中AMD仍然作为A型禽流感的治疗药在非法使用^[6]。因此,已经建立了许多分析方法以检测AMD的残留。

代谢研究表明,AMD在体内以原型形式存在并在体内积聚^[10]。目前,AMD检测方法包括液相色谱法^[11-12]、荧光液相色谱法^[13]、高效液相色谱法^[14-15]、毛细管区带电泳法^[16]、选择性和荧光分光光度法^[17]、气相色谱法^[18]、毛细管气体色谱法^[19]、五氟苯甲酰氯萃取衍生化气相色谱法^[20]和液相色谱-串联质谱法^[21]。虽然这些方法准确而敏感,但这些色谱方法需要昂贵的设备、繁杂的预处理、技术熟练的操作人员,因此,它们不适合AMD的现场筛查。可见,在动物源性食品中开发直观、灵敏、高效的AMD检测分析方法至关重要。酶联免疫吸附测定(ELISA)^[22]和胶体金免疫层析测定^[23]代表快速、特异、方便和高度敏感的方法,适用于分析大

量样品。在这项研究中,制备了一种针对AMD的新型单克隆抗体,为今后的免疫学快速检测提供技术上的支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

金刚烷胺,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、羟琥珀亚酰胺(NHS)、弗氏佐剂, Sigma公司产品;羊抗鼠酶标二抗,洛阳华美生物工程有限公司;其他试剂均为AR级。SPF级雌性BALB/c小鼠购自郑州大学实验动物中心,由周口师范学院神经转化医学实验动物中心饲养。

仪器设备:Thermo Scientific NanoDrop 2000c紫外分光光度计, Thermo Electron; Multiskan FC型酶标仪,上海赛默飞世尔仪器有限公司;LHS-450恒温培养箱,郑州生元仪器有限公司;AR224CN电子天平,上海奥豪斯仪器有限公司;凝胶成像系统及分析软件,上海天能科技股份有限公司;DYY-6D型电泳仪电源,北京六一生物科技有限公司;90-2定时恒温双向磁力搅拌器,上海精科实业有限公司;HCJ-4A数显恒温磁力搅拌水浴锅,常州市金坛区指前镇旭日实验仪器厂;SW-CJ-2G型超净工作台,苏州净华仪器有限公司;3701型二氧化碳培养箱,USA Precision公司。

1.2 方 法

1.2.1 AMD免疫原的合成及鉴定 参考Xu等报道的方法进行AMD免疫原的合成^[22]。80 mg AMD充分溶解在3 mL的甲苯和一定量的二碳酸二叔丁酯溶液中,然后加入105 mg 6-溴乙酸乙酯,在氮气保护下升温至128℃充分回流2 d,旋转蒸发后的产物调节pH值至10,然后调节pH值为1,干燥浓缩后得含有羧基的AMD半抗原(图1-A)。取12 mg AMD半抗原,加入3 mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,依次加入11 mg NHS,17 mg EDC,冰浴条件下搅拌反应18 h,得到A液;30 mg牛血清白蛋白(BSA)加入3 mL PBS溶液中(B液)。将A液慢速滴加到B液中,室温下反应1 d;放入透析袋中用PBS缓冲液透析3 d,制得AMD免疫原,其反应路线

收稿日期:2019-03-23

基金项目:河南省自然科学基金(编号:182300410093);河南省科技攻关项目(编号:182102310683)。

作者简介:范素菊(1981—),女,河南商水人,硕士,讲师,主要从事兽药残留的免疫学快速检测研究。E-mail:420721901@qq.com。

通信作者:杨兴东,博士,讲师,主要从事食品免疫学快速检测研究。E-mail:zyangxd@163.com。

见图1-B。利用紫外扫描和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[24]来判断AMD和载体蛋白是否成功偶联。

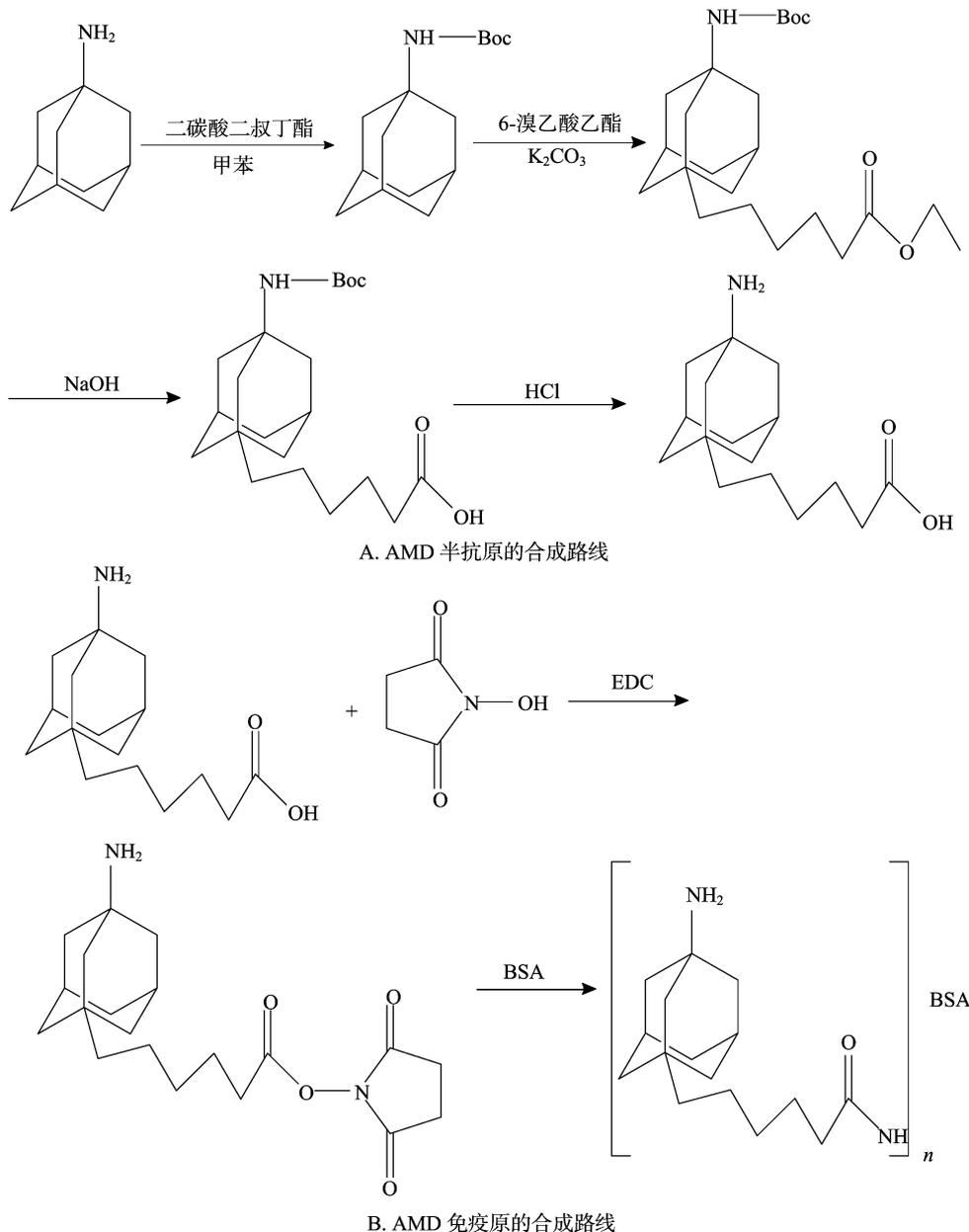


图1 AMD 半抗原的合成路线和 AMD 免疫原的合成路线

1.2.2 动物免疫 用70 mg 免疫原(AMD-BSA)和等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后,背部皮下多点注射到3只小鼠,间隔18 d之后用同样的剂量与弗氏不完全佐剂乳化后,对BALB/c小鼠进行免疫,先后共免疫5次;免疫结束后,小鼠尾静脉采血,得到抗AMD多克隆抗体血清(polyclonal antibody serum, pAbs),并进行鉴定。

1.2.3 单克隆抗体制备 利用融合剂PEG4000,将免疫最优小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞SP2/0按一定比例混合,并加入GNK溶液和HAT培养基,然后将混合液按0.1 ml/孔加入到铺有饲养细胞的细胞培养板中,用酶联免疫吸附试验(ELISA)筛选阳性孔,有限稀释法对筛选到的阳性孔进行亚克隆,得到抗AMD的杂交瘤细胞株,将细胞株注入到经液体

石蜡处理过的小鼠腹腔中,以此来制备抗AMD mAbs。

1.2.4 AMD mAbs 的鉴定

1.2.4.1 抗AMD mAbs 效价测定 间接ELISA检测抗AMD mAbs 效价^[25]:检测抗原(AMD-OVA)包被在ELISA板内;依次加入倍比稀释的AMD mAbs、酶标二抗和显色液,每步孵育一定时间后均用PBST洗板;加入终止液后,放入酶标仪进行测定。

1.2.4.2 抗AMD mAbs 敏感性测定 间接竞争ELISA检测mAbs对AMD的半数抑制浓度(IC₅₀),以此来鉴定其敏感性。其操作过程与间接ELISA的区别在于包板后,每孔加入D_{450 nm}值为1.0左右的mAbs和倍比稀释的AMD标准品。

1.2.4.3 AMD mAbs 特异性测定 依据交叉反应(cross

reaction, CR) 试验鉴定 AMD 的特异性。用间接竞争 ELISA 测定金刚乙胺、金刚烷、1-金刚烷羧酸、利巴韦林、吗啉胍、阿昔洛韦、呋喃唑酮等类似物的 IC_{50} 值。 $CR = (\text{金刚烷胺 } IC_{50} \text{ 值} / \text{其他化合物 } IC_{50} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 AMD 免疫原的鉴定结果

图2显示, BSA 的吸收峰(10 mm)在 280 nm 的位置, AMD 的吸收峰在 412 nm 的位置, AMD-BSA 的吸收峰(10 mm)与 BSA 的吸收峰相比发生了向右偏移, 表明半抗原 AMD 与 BSA 已经联结。BSA 的泳动速率略大于 AMD-BSA 的泳动速率(图3), 分析物分子质量的大小与泳动速率成反比, 由此可知 BSA 与 AMD 成功联结。

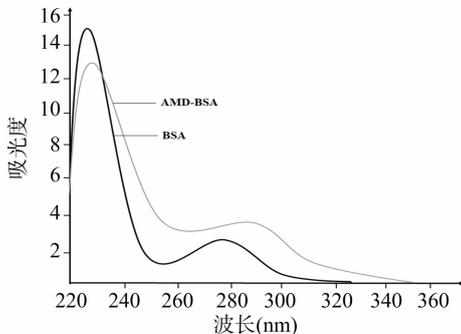


图2 BSA 和 AMD-BSA 的紫外扫描图谱

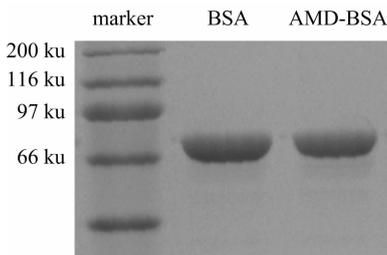


图3 BSA、AMD-BSA 的凝胶电泳

2.2 AMD pAbs 的效价、敏感性鉴定结果

免疫原(AMD-BSA)免疫的1号和2号 BABLC/c 小鼠的 pAbs 效价都达到 6.4×10^3 以上, 2号小鼠达到 1.28×10^4 (图4), 表明 AMD pAbs 效价较高, 免疫原(AMD-BSA)的免疫原性优良。3只被免小鼠的 mAbs 均有抑制的产生, 其中以3号被免小鼠的抑制最优(图5), 以 AMD 的稀释浓度的对数值为横坐标, 标准品测定值/不加标准品测定值 (B/B_0) 为纵坐标作图, 线性回归方程: $y = -0.4061x + 1.0086$, $r^2 = 0.9916$, 由此方程推算出 AMD 的 IC_{50} 值为 $17.88 \mu\text{g/L}$, 进一步表明 mAbs 具有较高的敏感性。

2.2 AMD mAbs 的鉴定结果

2.2.1 效价测定结果 利用 ELISA 筛选出4株杂交瘤细胞稳定分泌的 AMD mAbs, 其效价较高, 其中 2D5 细胞株的上清液效价最优, 用此株诱生抗 AMD 的腹水, 效价为 2.15×10^5 (表1)。

2.2.2 敏感性界定结果 间接竞争 ELISA 测定细胞株的 AMD mAbs 的回归方程为 $y = -0.3116x + 0.5024$ ($r^2 = 0.9903$) (图6), 2D5 对 AMD 的 IC_{50} 为 $1.02 \mu\text{g/L}$, 进一步表明本研究所制得的 mAbs 对 AMD 的敏感性较好。

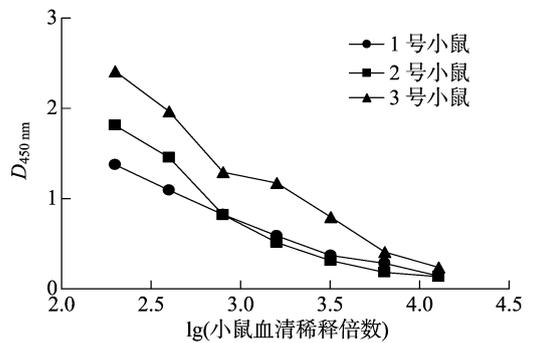


图4 AMD pAbs 效价测定结果

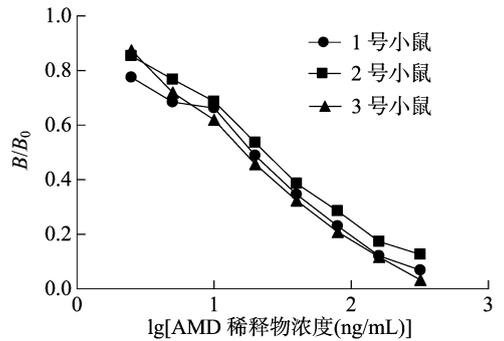


图5 间接竞争 ELISA 测定 AMD pAbs 的 IC_{50}

表1 间接 ELISA 测定 AMD mAbs 的效价

杂交瘤细胞	AMD mAbs 的效价	
	上清液	腹水
1F8	3.6×10^2	
2D5	1.0×10^3	5.12×10^5
3G10	5.0×10^2	
3B4	5.0×10^2	

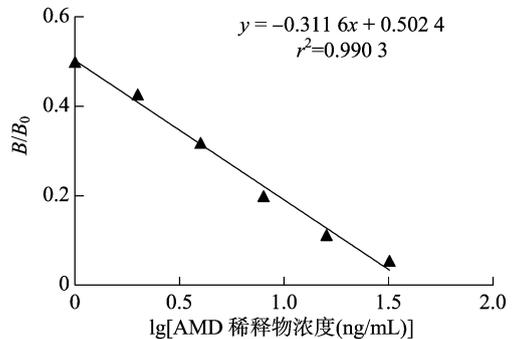


图6 mAbs 对 AMD 的间接竞争 ELISA 抑制曲线

2.2.3 AMD mAbs 的特异性鉴定结果 AMD mAbs 与金刚乙胺的 CR 为 9.82%, 与金刚烷、1-金刚烷羧酸、利巴韦林、吗啉胍、阿昔洛韦、呋喃唑酮等类似物没有 CR (表2), 进一步表明 AMD mAbs 特异性较强。

3 讨论与结论

高质量的抗原是制备优质抗体的基础。根据文献报道, Xu 等首先利用二碳酸二叔丁酯保护 AMD 上的氨基, 然后使用 6-溴乙酸乙酯在 AMD 上引入活性基团 $[-(\text{CH}_2)_5\text{COOH}]$, 运用 EDC/NHS 法与载体蛋白 (BSA 或

表2 AMD mAbs与AMD类似物的CR

竞争物	IC ₅₀ 值 ($\mu\text{g/L}$)	CR (%)
金刚烷胺(AMD)	1.02	100.0
金刚乙胺(rimantadine)	10.39	9.82
金刚烷(adamantane)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01
1-金刚烷羧酸(1-adamantane carboxylic acid)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01
利巴韦林(ribavirin)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01
吗啉胍(morpholinium)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01
阿昔洛韦(acyclovir)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01
呋喃唑酮(furazolidone)	$>1.1 \times 10^3$	<0.01

OVA)进行连接,免疫小鼠后的AMD mAbs IC₅₀值为50 $\mu\text{g/L}$ ^[22];Wu等采用EDC和乙二胺改造载体蛋白(BSA或OVA)的羧基位点使之转换为氨基,然后利用戊二醛法使AMD与载体蛋白发生偶联;制备所得多抗具备一定效价,免疫小鼠后,获得的AMD mAbs具有较高的效价(1×10^4 以上),但对AMD的抑制率偏低(10%以下)^[23]。

虽然紫外扫描、色谱法、SDS-PAGE等通常被用来鉴定免疫原的制备结果,但是紫外扫描由于半抗原和载体蛋白及偶联物的溶解基质不同,同时不用的浓度产生的波峰不尽相同,所以判定起来存在困难;色谱法存在操作繁杂、耗时长和须要不断地熟悉操作等缺点,现实应用起来较为吃力;AMD的分子质量较小(<200),与载体蛋白的偶联数目有限[1:(10~25)],使得通过SDS-PAGE来判定是否成功联结判定结果很难用肉眼区分开来。小鼠血清的IC₅₀鉴定是判断成功偶联最可靠的手段,但是等待时间较长,一旦失败,须从头再来,使得试验周期大大增加。综上所述,寻找切实可行的免疫原的鉴定方法是广大免疫工作者须解决的问题。

本研究小鼠的效价均在 6.4×10^3 以上,利用细胞融合技术筛选出4株特异性、特异性较强的细胞株,制备出AMD mAbs,并对其效价、敏感性及特异性进行了鉴定,mAbs对AMD的IC₅₀为1.02 $\mu\text{g/L}$,结果表明,以该抗体为基础,能够为以后AMD残留的免疫检测方法的建立提供技术支持。

参考文献:

[1] Pabbaraju K, Ho K C, Wong S, et al. Adamantane resistance in circulating human influenza A viruses from Alberta, Canada (1970—2007) [J]. *Antiviral Research*, 2008, 79(2): 81—86.

[2] Monod A, Swale C, Tarus B, et al. Learning from structure-based drug design and new antivirals targeting the ri-bonucleoprotein complex for the treatment of influenza [J]. *Expert Opinion on Drug*, 2015, 10(4): 345—371.

[3] Pahwa R, Tanner C M, Hauser R A, et al. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED study) [J]. *Movement Disorders*, 2015, 30(6): 788—795.

[4] Hao X, Li N, Xu Z, et al. An electrochemical sensing strategy for amantadine detection based on host-guest interaction of methylene blue/b-cyclodextrin/poly(N-acetylaniline) modified electrode [J]. *Electroanalysis*, 2016, 28(7): 1489—1494.

[5] Zhang J Z, Zhao J, Zhou J H, et al. Determination of amantadine residue in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorometric detection [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2011, 29

(8): 1764—1768.

[6] He G, Qiao J, Dong C, et al. Amantadine-resistance among H₅N₁ avian influenza viruses isolated in northern China [J]. *Antiviral Research*, 2008, 77(1): 72—76.

[7] Bright R A, Shay D K, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005—2006 influenza season in the United States [J]. *Journal of the American Medical Association*, 2006, 295(8): 891—894.

[8] Cheung C L, Rayner J M, Smith G J, et al. Distribution of amantadine-resistant H₅N₁ avian influenza variants in Asia [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2006, 193(12): 1626—1629.

[9] Arndt T, Gueesregen B, Hohl A, et al. Determination of serum amantadine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 359(1/2): 125—131.

[10] Morrison D, Roy S, Rayner C, et al. A randomized, crossover study to evaluate the pharmacokinetics of amantadine and oseltamivir administered alone and in combination [J]. *PLoS One*, 2007, 2(12): 1694—1702.

[11] Higashi Y, Fujii Y. Liquid chromatographic determination of 1-adamantanamine and 2-adamantanamine in human plasma after pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and 1-thio- β -d-glucose [J]. *Journal of Chromatography (B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences)*, 2004, 799(2): 349—354.

[12] Higashi Y, Nakamura S, Matsumura H, et al. Simultaneous liquid chromatographic assay of amantadine and its four related compounds in phosphate-buffered saline using 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole as a fluorescent derivatization reagent [J]. *Biomedical Chromatography*, 2006, 20(5): 423—428.

[13] Duh T H, Wu H L, Pan C W, et al. Fluorimetric liquid chromatographic analysis of amantadine in urine and pharmaceutical formulation [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1088(1/2): 175—181.

[14] Shuangjin C, Fang F, Han L, et al. New method for high-performance liquid chromatographic determination of amantadine and its analogues in rat plasma [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44(5): 1100—1105.

[15] Higashi Y, Uemori I, Fujii Y. Simultaneous determination of amantadine and rimantadine by HPLC in rat plasma with pre-column derivatization and fluorescence detection for pharmacokinetic studies [J]. *Biomedical Chromatography*, 2005, 19(9): 655—662.

[16] Chen H X, Zhang X X. Antibody development to testosterone and its application in capillary electrophoresis-based immunoassay [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(16): 3406—3413.

[17] Mahmoud A M, Khalil N Y, Darwish I A, et al. Selective spectrophotometric and spectrofluorometric methods for the determination of amantadine hydrochloride in capsules and plasma via derivatization with 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate [J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 2009: 810104.

[18] Farajzadeh M A, Nouri N, Alizadeh Nabil A A. Determination of amantadine in biological fluids using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-flame ionization detection [J]. *Journal of chromatography (B, Analytical Technologies in the Biomedical and*

- tilapia gelatin diminishes free radical formation in murine microglial cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(22):12193-12197.
- [9] 孙宏. 菌酶协同处理棉籽粕的营养特性、棉籽肽的制备及其抗氧化活性研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.
- [10] 姚晓红,吴逸飞,王新,等. 菌酶协同制备菜籽肽工艺的优化及其营养成分分析[J]. *饲料工业*,2011,32(18):47-51.
- [11] Jiang H W, Li H Y, Yu C W, et al. The evaluation of antioxidant interactions among 4 common vegetables using isobolographic analysis[J]. *Journal of Food Science*,2015,80(6):1162-1165.
- [12] Tian F, Li B, Jia B P, et al. Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*; the polarity affects the bioactivities[J]. *Food Chemistry*,2009,113(1):173-179.
- [13] 陈乃富. 蕨菜黄酮类化合物的提取及其抗氧化作用[J]. *食品与发酵工业*,2003(11):63-66.
- [14] 刘昭明,黄翠姬,孟陆丽,等. 核桃蛋白中性蛋白酶水解物的制备及其抗氧化活性研究[J]. *安徽农业科学*,2008,36(35):15696-15697,15701.
- [15] 潘瑶,郑时莲,邹兴平,等. 葡萄、芒果、草莓乙醇提取物抗氧化活性组分分析及其抗氧化相互作用[J]. *食品科学*,2017,38(4):133-140.
- [16] 朱夕波. 鲨鱼皮和猪皮胶原蛋白及其抗氧化活性酶解物的特性研究[D]. 上海:上海海洋大学,2008.
- [17] Yang M, Shen Q, Li L Q, et al. Phytochemical profiles, antioxidant activities of functional herb *Abrus cantoniensis* and *Abrus mollis*[J]. *Food chemistry*,2015,177:304-312.
- [18] Luszczki J J, Antkiewicz M L, Czuczwar S J. Isobolographic analysis of interactions between 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and four conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model[J]. *European Journal of Pharmacology*,2009,602(2/3):298-305.
- [19] 张晖,唐文婷,王立,等. 抗氧化肽的构效关系研究进展[J]. *食品与生物技术学报*,2013,32(7):673-679.
- [20] Nicoli M C, Anese M, Parpinel M T, et al. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage[J]. *Cancer Letters*, 1997,114(1/2):71-74.
- [21] Zhu C Z, Zhang W G, Kang Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. *Meat Science*,2014,96(2):783-789.
- [22] 刘丹. 秋刀鱼蛋白抗氧化肽的分离纯化及其抗疲劳功效研究[D]. 广州:华南理工大学,2015.
- [23] 陈日春. 鲢鱼鱼鳞胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [24] 刘晶晶,王焯,韩曜平,等. 河蚬抗氧化肽抗氧化稳定性研究[J]. *食品工业科技*,2015,36(6):86-89.
- [25] Korzeniowska M, Cheung I W, Li-Chan E C. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod[J]. *Food Chemistry*,2013,138(2/3):1967-1975.
- [26] 唐宁,庄红. 玉米抗氧化肽 Leu-Pro-Phe 抗氧化稳定性研究[J]. *中国食品学报*,2015,15(2):49-55.
- [27] You S J, Udenigwe C C, Aluko R E, et al. Multifunctional peptides from egg white lysozyme[J]. *Food Research International*,2010,43(3):848-855.
- [28] 李艳伏. 核桃粕多肽提取分离及功能特性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [29] Labrinea E P, Georghiou G A. Stop-flow method for assessment of pH and time effect on the ABTS total antioxidant capacity assay[J]. *Analytica Chimica Acta*,2004,526(1):63-68.
- [30] Ip C, Thompson H J, Zhu Z J, et al. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: Evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention[J]. *Cancer Research*,2000,60(11):2882-2886.
- [31] Pinelo M, Manzocco L, Nunez M J, et al. Interaction among phenols in food fortification: negative synergism on antioxidant capacity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2004,52(5):1177-1180.
- [32] 胡晓赟. 小肽抗氧化性及协同作用研究[D]. 无锡:江南大学,2012.
- [33] Cheetangdee N. Effects of rice bran protein hydrolysates on the physicochemical stability of oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Oleo Science*,2014,63(12):1231-1241.
- (上接第223页)
- Life Sciences),2013,940:142-149.
- [19] Yao W, Luo X, Hu Y. Determination of amantadine sulfate in sodium chloride injection by capillary gas chromatography[J]. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*,2006,60(3):138-143.
- [20] Ho C, Wong Y T. Fast and high throughput screening of amantadine in chicken muscle by extractive derivatization with pentafluorobenzoyl chloride and gas chromatography/negative ion chemical ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*,2014,97(4):1220-1224.
- [21] Berendsen B J, Wegh R S, Essers M L, et al. Quantitative trace analysis of a broad range of antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,2012,402(4):1611-1623.
- [22] Xu L, Peng S, Liu L, et al. Development of sensitive and fast immunoassays for amantadine detection[J]. *Food and Agricultural Immunology*,2016,27(5):678-688.
- [23] Wu S, Zhu F, Hu L, et al. Development of a competitive immunochromatographic assay for the sensitive detection of amantadine in chicken muscle[J]. *Food Chemistry*,2017,232:770-776.
- [24] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999:56-60.
- [25] 姚静静,胡晓飞,韩俊岭,等. 伏马菌素 B1 单克隆抗体的制备及免疫学检测方法初步应用[J]. *畜牧兽医学报*,2016,47(5):1009-1017.