

吴 萌,吴海涛,圣志存,等. 呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备与鉴定[J]. 江苏农业科学,2022,50(17):192-197.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.031

呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备与鉴定

吴 萌,吴海涛,圣志存,陈晓兰,苏棣华,柳青青

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:制备了呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-噁唑烷酮(AOZ)的人工抗原,再采用重氮法将 AOZ 衍生物 2-NP-AOZ 与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联,制备免疫原 2-NP-AOZ-BSA 和包被原 2-NP-AOZ-OVA,通过 SDS-PAGE、MALDI-TOF-MS 分析其偶联效果。以 2-NP-AOZ-BSA 皮下注射免疫 SPF 级 BALB/c 小鼠,分别于 3 次免疫和 5 次免疫后制备血清,以间接 ELISA 检测血清中 2-NP-AOZ 抗体效价,间接竞争 ELISA 检测血清敏感性,鉴定其免疫原性。发现 2-NP-AOZ 分别与 BSA 和 OVA 偶联成功,获得免疫原 2-NP-AOZ-BSA 和包被原 2-NP-AOZ-OVA;MALDI-TOF-MS 分析测得偶联率分别为 7.1:1、3.8:1;BCA 试剂盒检测 2-NP-AOZ-BSA、2-NP-AOZ-OVA 的浓度分别为 4.9、5.2 mg/mL。间接 ELISA 检测 3 次免疫后小鼠血清抗体效价均达 1:16 000 及以上,5 次免疫后血清抗体效价均达 1:32 000 及以上;半数抑制浓度(IC₅₀)为 34.43 ng/mL,人工抗原 2-NP-AOZ-BSA 免疫原性优良。本研究成功合成了 AOZ 完全抗原,为 AOZ 单克隆抗体制备及快速检测方法建立奠定了基础。

关键词:呋喃唑酮代谢物(AOZ);偶联;人工抗原;ELISA

中图分类号:S852.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0192-06

呋喃唑酮(furazolidone),学名 3-(5-硝基糠醛缩氨基)-2-噁唑烷酮,又名痢特灵,属于硝基呋喃类药物,具有广谱的抗菌作用;现代药理毒理试验研究表明,呋喃唑酮在机体内代谢周期短、易衰减,主要代谢物为 3-氨基-2-噁唑酮(AOZ)^[1-2],分子结构式,结果见图 1-A,AOZ 可与机体内组织蛋白紧密结合,从而残留数周,对人体具有潜在的致癌、致突变作用^[3]。因此,我国相关法规明确规定严禁动物性食品中添加包括呋喃唑酮在内的硝基呋喃类药物。但在实际生产中,由于呋喃唑酮预防和治疗细菌性感染效果显著且价格低廉,所以仍存在非法使用的情况。因此,建立快速、简便的检测方法自然尤为重要。由于呋喃唑酮衰减原因,研究者们大多以 AOZ 作为标志物检测呋喃唑酮是否非法使用^[4]。

目前,检测呋喃唑酮代谢物 AOZ 残留常用的方法为液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[5-6],具有检测灵敏度高、结果准确性好等优点,但存在前样处理复杂、检测时间长、成本昂贵等问题^[7],尤其不适合大批量样品的快速筛查。免疫分析法因灵敏度高、特异性强、简便、样品高通量及成本低等优点也成为检测呋喃唑酮代谢物的一种重要手段^[8],其建立的关键是获得免疫学特性优良的抗体,而抗体获得的前提条件为制备待测物的免疫原。

AOZ 分子量较小,前期研究显示直接将其偶联蛋白质获得的人工抗原几乎无免疫原性,不能满足生产高效价抗体的要求。目前,研究者先将 AOZ 衍生化,研究最多的将 AOZ 与带环的化学物质 4-羧基苯甲醛反应生成衍生物 3-(4-羧基苯亚甲基)-氨基-2-噁唑烷酮(CP-AOZ)(分子结构式见图 1-B)^[9],再将衍生物与蛋白质偶联,制备人工抗原,获得抗体用于免疫检测。本研究选择 AOZ 衍生物 2-NP-AOZ(分子结构式见图 1-C),将其分别与 BSA 和 OVA 偶联制备完全抗原,并通过凝胶电泳、MALDI-TOF-MS 鉴定其偶联效果,以合成人工抗原免疫 BALB/c 小鼠,通过酶联免疫方法测定小鼠血清抗体效价与敏感性,分析人工抗原的免疫原性。

收稿日期:2022-03-30

基金项目:江苏省高等学校自然科学研究面上项目(编号:20KJB230012);江苏省泰州市科技支撑计划(社会发展)项目(编号:TS201922);江苏农牧科技职业学院校级科研项目(编号:NFS2021ZR09);江苏省大学生创新创业训练计划(编号:202112806018Y)。

作者简介:吴 萌(1990—),女,山东济宁人,硕士,讲师,从事兽用生物制品研究。E-mail:245853542@qq.com。

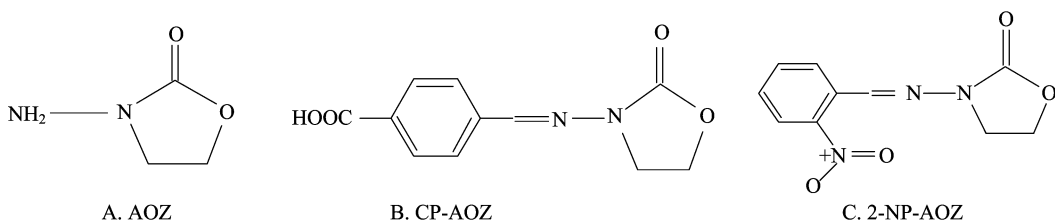


图1 AOZ 及其衍生物分子结构式

1 材料与方法

1.1 试验动物

试验于 2020 年 12 月于江苏农牧科技职业学院生物制药技术实验室完成。SPF 级 BALB/c 小鼠(6 周龄,雌性),购自扬州大学比较医学中心。

1.2 试剂及仪器设备

2-NP-AOZ:纯度 $\geq 99.9\%$,坛墨质检科技股份有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、牛血清白蛋白(BSA):纯度 $\geq 98\%$;鸡卵清白蛋白(OVA):纯度 $\geq 98\%$,默克集团(Merck);BCA 蛋白定量试剂盒、明胶封闭缓冲液、ELISA 显色液与终止液、HRP-羊抗小鼠二抗:生工生物工程(上海)股份有限公司;1×PBS(pH 值 7.2~7.4)缓冲液、1×PBST 缓冲液(pH 值 7.2~7.4):北京索宝来科技有限公司;乙腈、亚硝酸钠:均为 AR,阿拉丁试剂(上海)有限公司。

DK-S11 数显水浴锅,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;4800 Plus MALDI-TOF/TOF 质谱仪,AB SCIEX 公司;3500BR 全自动凝胶成像分析系统,上海天能科技有限公司;VE180 垂直电泳仪,上海天能科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 完全抗原的合成 采用重氮法^[10]合成呋喃唑酮代谢物 AOZ 的完全抗原,包括免疫原 2-NP-AOZ-BSA 和包被原 2-NP-AOZ-OVA。准确称取 AOZ 衍生物(2-NP-AOZ)5 mg,溶解于 500 μ L 乙腈中,加入 2 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸,搅拌,再加入 2 mg 锌粉,振荡混匀;水浴中加热 20 min,取上清冷却至 4 $^{\circ}$ C,获得 2-NP-AOZ 还原液。1 mol/L 盐酸调节还原液 pH 值至 1.0~2.0,加入 2 mol/L 亚硝酸钠溶液,至淀粉碘化钾试纸检验呈灰蓝色。将上述混合液逐滴加至 1 mL 含 50 mg 的 0.01 mol/L BSA 且 pH 值为 7.4 的 PBS 溶液中,搅拌,调节 pH 值至 8.5,避光条件下振荡 1 h,放置在 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。PBS 透析 4 h,5 000 r/min 离心 10 min,收集上

清,即为免疫原 2-NP-AOZ-BSA。包被原 2-NP-AOZ-OVA 的制备方法同上,以 OVA 代替 BSA。

1.3.2 完全抗原浓度的测定 采用 BCA 试剂盒法测定人工抗原的浓度。将试剂盒中 BSA 标准品溶液(5 mg/mL)以 PBS 稀释成 0.000、0.025、0.050、0.100、0.200、0.300、0.400、0.500 mg/mL,分别取稀释好的 BSA 标准品和待测人工抗原各 20 μ L 置于 96 孔板中,加入 200 μ L/孔 BCA 工作液,混匀;37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 min。冷却至室温后,在酶标仪中测定各孔的 $D_{562\text{ nm}}$ 值。以标准组各管 $D_{562\text{ nm}}$ 平均值为纵坐标,对应的蛋白质浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算待测人工抗原的浓度。

1.3.3 紫外扫描光谱鉴定合成的完全抗原 将 2-NP-AOZ-BSA 和 2-NP-AOZ-OVA 稀释至 0.5 mg/mL,以 BSA、OVA、2-NP-AOZ 标准品溶液作为对照,在 200~400 nm 范围内对上述溶液进行紫外光谱扫描,记录图谱,根据人工抗原与 2-NP-AOZ 标准品和载体蛋白 BSA(OVA)吸收峰的变化判断偶联效果。

1.3.4 SDS-PAGE 鉴定合成的完全抗原 将待测品 BSA、OVA、2-NP-AOZ-BSA 与 2-NP-AOZ-OVA 均配制为 0.5 mg/mL 溶液,分别与 5×SDS Loading Buffer 按照 5:1 体积比混合,煮沸 10 min。取煮沸后待测样各 20 μ L 加入上样孔,经 10% 分离胶分离;电泳结束后以考马斯亮蓝染色液染色 1 h 后,脱色,至蛋白条带清晰无杂色。根据条带位置即蛋白泳动速度判断偶联是否成功。

1.3.5 MALDI-TOF-MS 鉴定合成的完全抗原 将 2-NP-AOZ-BSA 和 2-NP-AOZ-OVA 稀释至 1 mg/mL,经脱盐处理后分别与基质溶液混合,BSA 和 OVA 溶液作为对照。点靶,置于质谱仪内进行激光扫描,获取离子质谱图,根据样品相对分子量判断是否偶联成功并计算偶联比。偶联比 = $(M_{\text{人工抗原}} - M_{\text{载体蛋白}}) / M_{\text{半抗原}}$,其中: M 表示相对分子质量。

1.3.6 动物免疫 选 6 只 6 周龄雌性 SPF 级

BALB/c 小鼠,4 只以 2-NP-AOZ-BSA 为免疫原免疫;1 只为空白对照,以 PBS 为免疫原免疫;1 只为阴性对照,相同的条件下饲养。首次免疫时加入等量的弗氏完全佐剂混合,以 50 $\mu\text{g}/\text{只}$ 多点皮下注射。第 2、第 3、第 4 次免疫时用等量的弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂与免疫原混匀;第 5 次免疫时不添加 7 d 后采血,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h 后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,3 000 r/min 离心 10 min,收集上清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.7 免疫血清效价的测定 采用间接 ELISA^[11] 测定血清效价。将包被原 2-NP-AOZ-OVA 稀释至 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,以 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 包被于 96 孔 ELISA 板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 洗板,3 次后加入 250 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1% 明胶封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 洗板,3 次后加入倍比稀释的多抗血清 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,并设置阴性、空白对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;PBST 洗板,3 次后加入稀释好的羊抗鼠酶标二抗 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h;PBST 洗板后,加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ TMB 显色液,避光反应 10 min 后加入终止液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。酶标仪上选定空白对照后,测定 $D_{450\text{ nm}}$ 值,待测孔 $D_{450\text{ nm}}$ 为 P ,阴性对照 $D_{450\text{ nm}}$ 为 N ,当 $P \geq 0.2$ 且 $P/N \geq 2.1$ 时,判定为阳性。

1.3.8 免疫血清敏感性的测定 采用间接竞争 ELISA^[12] 测定 AOZ 免疫血清的敏感性。将 2-NP-AOZ-OVA 包被至 ELISA 板上,加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 不同质量浓度的 2-NP-AOZ 标准品 (1 000. 000、500. 000、250. 000、125. 000、62. 500、31. 250、15. 625、7. 813、3. 906、1. 953、0. 000 ng/mL) 和 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ $D_{450\text{ nm}}$ 为 1.0 对应稀释倍数的多抗血清;最后一孔只添加 50 μL 的 PBS,设置为空白对照。其他步骤见“1.3.7”节。以 B/B_0 (B 代表不同质量

浓度 2-NP-AOZ 标准品孔的 $D_{450\text{ nm}}$, B_0 代表 2-NP-AOZ 标准品质量浓度为 0 时的 $D_{450\text{ nm}}$) 为纵坐标,以 2-NP-AOZ 标准品质量浓度对数为横坐标绘制抑制曲线,计算 AOZ 多抗的半数抑制浓度 IC_{50} ,并通过 IC_{50} 判断抗体的敏感性^[13]。

2 结果与分析

2.1 完全抗原浓度的测定

由图 2 可知,线性回归方程式为 $y = 0.9124x + 0.1104$, $r^2 = 0.9961$,计算人工抗原 2-NP-AOZ-BSA 浓度为 4.9 mg/mL ,2-NP-AOZ-OVA 浓度为 5.2 mg/mL 。

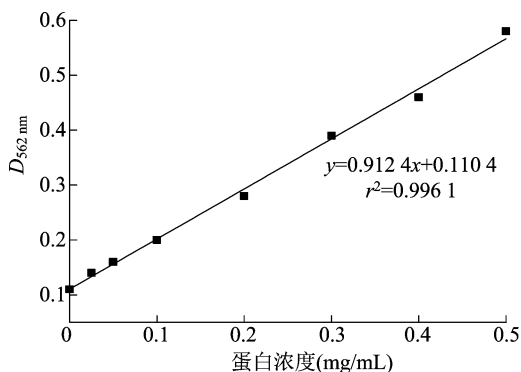


图2 BCA 法测定蛋白质浓度的标准曲线

2.2 完全抗原的紫外光谱扫描测定

由图 3-A 可知,BSA 在 279 nm 左右有最大吸收峰,2-NP-AOZ-BSA 的特征性吸收峰相比 BSA 有一定程度的偏移,且与 2-NP-AOZ 的紫外光谱图和趋势不同,初步判断 2-NP-AOZ 与 BSA 偶联成功。

由图 3-B 可知,2-NP-AOZ-OVA 的紫光吸收曲线较 OVA 与 2-NP-AOZ 均发生明显变化,初步判断 2-NP-AOZ 与 OVA 偶联成功。

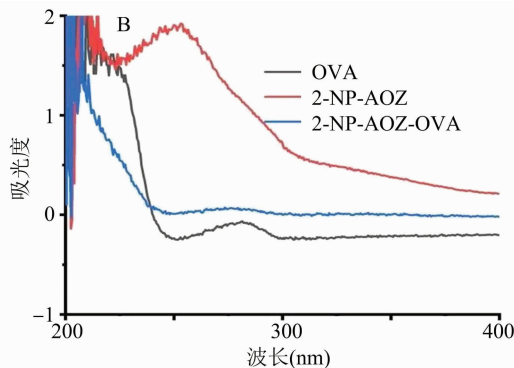
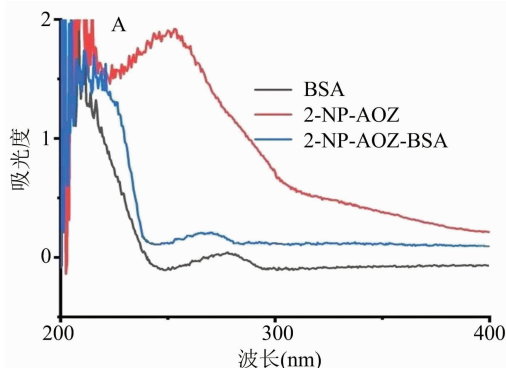


图3 2-NP-AOZ-BSA 与 2-NP-AOZ-OVA 的紫外全波长扫描结果

2.3 完全抗原的 SDS-PAGE 鉴定

由图 4 可知,相同条件下 2-NP-AOZ-BSA

的迁移速率小于 BSA,2-NP-AOZ-OVA 的迁移速率小于 OVA,均出现了明显的拖尾现象。说明

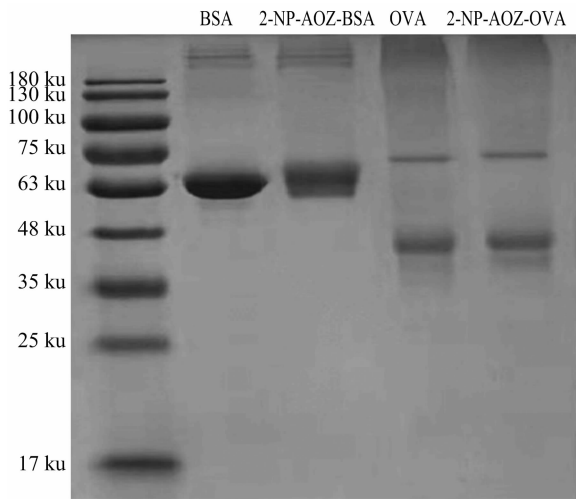


图4 2-NP-AOZ-BSA 与 2-NP-AOZ-OVA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

2-NP-AOZ-BSA 分子量明显大于 BSA, 2-NP-AOZ-OVA 分子量明显大于 OVA, 推测 BSA、OVA

均成功偶联了部分 2-NP-AOZ, 可初步判定免疫原与包被原合成成功。

2.4 完全抗原的 MALDI-TOF-MS 分析

由图 5 可知, 人工抗原 2-NP-AOZ-BSA 与 2-NP-AOZ-OVA 相对分子量较载体蛋白相对分子量明显增大, 与 SDS-PAGE 显示人工抗原比载体蛋白泳动速度慢的结果一致, 表明偶联成功。由图 5-A 可知, 2-NP-AOZ-BSA 的相对分子量为 67 892.54, BSA 的相对分子量为 66 228.92; 由图 5-B 可知, 2-NP-AOZ-OVA 的相对分子量为 45 383.69, OVA 的相对分子量为 44 484.31, 根据 2-NP-AOZ 相对分子量大小, 得出 2-NP-AOZ 与 BSA 的偶联比为 7.1 : 1, 2-NP-AOZ 与 OVA 的偶联比为 3.8 : 1。

2.5 免疫血清效价的测定

由表 1、表 2 可知, 4 只以 2-NP-AOZ-BSA

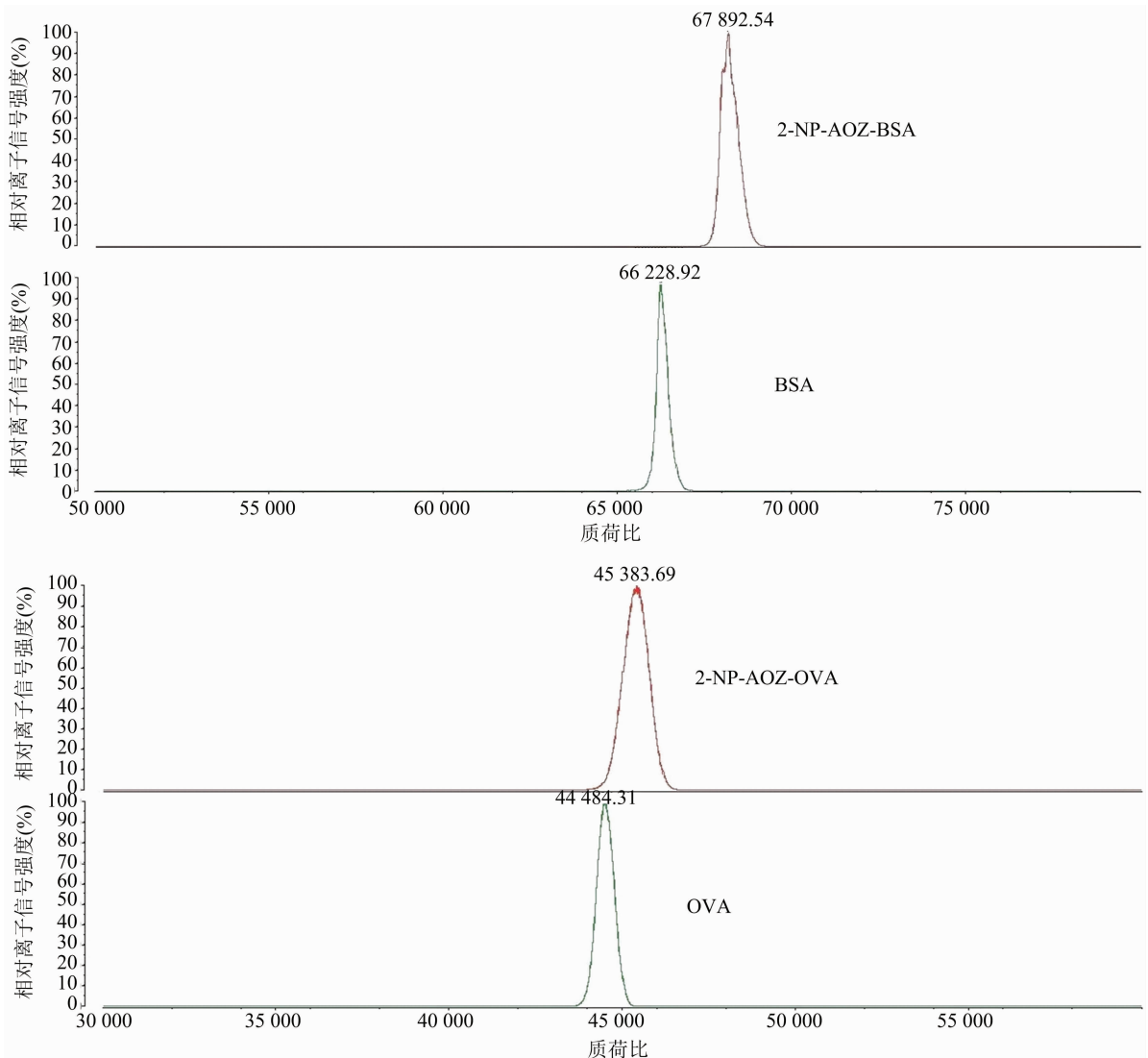


图5 2-NP-AOZ-BSA 与 2-NP-AOZ-OVA 的 MALDI-TOF 鉴定结果

为免疫原进行免疫的小鼠经 3 次免疫后血清效价均达 1 : 16 000 及以上;经 5 次免疫后血清效价均达 1 : 32 000 及以上。以 2 - NP - AOZ - OVA 为包被原检测小鼠血清,避免了血清中针对载体蛋白的抗原 - 抗体特异性反应,表明以合成的免疫原免疫小鼠后产生了针对 2 - NP - AOZ 的抗体,且随着免疫次数增加,人工抗原免疫效果增强。

表 1 3 次免疫后小鼠血清效价测定结果

血清稀释 倍数	$D_{450\text{ nm}}$			
	1 号	2 号	3 号	4 号
500	2.135	2.100	1.998	2.014
1 000	1.920	1.898	1.792	1.808
2 000	1.497	1.456	1.340	1.403
4 000	1.104	1.098	1.024	1.061
8 000	0.667	0.612	0.508	0.539
16 000	0.413	0.390	0.301	0.331
32 000	0.223	0.209	0.168	0.177
阴性	0.082	0.075	0.064	0.072

表 2 5 次免疫后小鼠血清效价测定结果

血清稀释 倍数	$D_{450\text{ nm}}$			
	1 号	2 号	3 号	4 号
500	2.725	2.703	2.587	2.601
1 000	2.491	2.410	2.313	2.308
2 000	2.099	1.984	1.891	1.923
4 000	1.500	1.422	1.305	1.383
8 000	1.014	0.948	0.827	0.898
16 000	0.723	0.710	0.668	0.687
32 000	0.471	0.465	0.403	0.423
阴性	0.072	0.069	0.070	0.065

2.6 免疫血清敏感性的测定

以 1 号小鼠免疫血清为例,通过间接竞争 ELISA 测定免疫血清的敏感性。由图 6 可知,2 - NP - AOZ 对小鼠免疫血清有抑制作用,其线性回归方程式为 $y = -0.254x + 0.890\ 3$, r^2 为 0.986 5, IC_{50} 为 34.43 ng/mL。免疫血清敏感性鉴定结果说明,2 - NP - AOZ 与载体蛋白成功偶联,合成了免疫原性良好的人工抗原,该抗原能有效刺激机体产生特异性免疫应答,可产生敏感性较好的抗 2 - NP - AOZ 的血清。

3 讨论

免疫学认为相对分子量小于 1 000 u 的分子仅具备反应原性,无免疫原性。呋喃唑酮代谢物

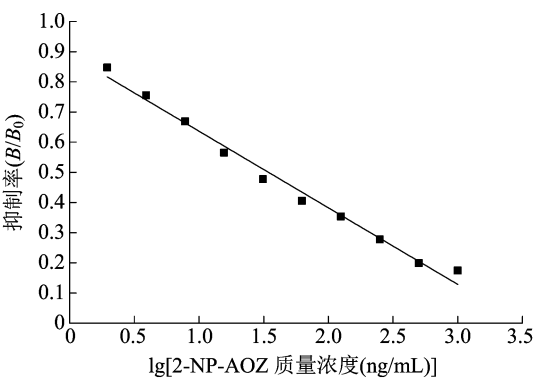


图 6 免疫血清对 2 - NP - AOZ 的间接竞争 ELISA 抑制曲线

(AOZ) 分子量为 102,为典型小分子物质,因此不能刺激机体产生免疫应答,必须与大分子物质如蛋白质载体偶联,形成完全抗原后才具有免疫原性。本研究前期曾尝试以 AOZ 直接连接载体蛋白 BSA 来生产制备抗体,但效果不理想,这与李敏等的结果^[14-15]一致;原因可能是 AOZ 分子量太小,直接偶联载体蛋白会被蛋白质分子包裹,不能形成有效的抗原表位,导致产生的抗体免疫学特性较差^[14-16],通常以 AOZ 衍生物(即在 AOZ 上连接 1 个间隔臂)代替 AOZ 合成人工抗原。相关研究表明,免疫效果与间隔臂有关,间隔臂长度为 3 ~ 6 个碳为宜^[17];除此之外,具有苯环的半抗原分子制备抗体的成功率为 30%,而不含苯环则成功率仅为 9%^[18-19]。温丹华等选择 AOZ 衍生物 CP - AOZ 合成人工抗原,制备抗体,建立免疫学检测方法^[8,20],与前人研究常用的 AOZ 衍生物不同,本研究选择了同样具有苯环的 AOZ 衍生物 2 - NP - AOZ 合成人工抗原,原因是后期建立 AOZ 免疫学检测方法时需要将检测样品衍生化,常得到的衍生化产物为 2 - NP - AOZ,且市面上有 2 - NP - AOZ 的标准品而无 CP - AOZ 的标准品。

小分子与蛋白质是否偶联成功可用多种方法鉴定,如紫外吸收光谱法、红外吸收光谱法、SDS - PAGE、核磁共振氢谱、质谱等。由于 2 - NP - AOZ 中含有可还原硝基,本研究采用重氮法分别与 BSA 和 OVA 偶联获得免疫原和反应原;先通过 SDS - PAGE 判定偶联效果,结果显示,偶联物的泳动速度小于载体蛋白的泳动速度,初步证明偶联成功。然后通过 MALDI - TOF - MS 分析分子偶联物和载体蛋白的分子量差别,判断偶联成功。Erlange 研究发现,偶联率 3 ~ 25 : 1 比较合适^[21];但也有学者认为半抗原与载体蛋白的偶联比对诱导抗体产生无决

定性影响。本研究采用 MALDI - TOF - MS 分析法根据相对分子量差异计算偶联比,简单快速且结果准确,得出 2 - NP - AOZ 与 BSA 偶联比为 7.1 : 1,与 OVA 偶联比为 3.8 : 1,均在适宜范围内。

半抗原与载体蛋白反应合成的人工抗原,虽然从其分子结果已经证明偶联成功,但合成的免疫抗原是否具有免疫原性,最终必须通过免疫学试验来检验^[22]。本研究以 2 - NP - AOZ - BSA 为免疫原免疫小鼠,3 次免疫后血清效价均达 1 : 16 000 及以上,5 次免疫后血清效价均达 1 : 32 000 及以上,说明人工合成的抗原能有效刺激机体产生免疫反应,具有良好的免疫原性,且免疫次数增多,免疫效果增强。

4 结论

本研究以 AOZ 的衍生物 2 - NP - AOZ 分别偶联 BSA 和 OVA,制备免疫原 2 - NP - AOZ - BSA 和包被原 2 - NP - AOZ - OVA,经紫外光谱扫描、SDS - PAGE、MALDI - TOF - MS 分析初步判断偶联成功,偶联率分别为 7.1 : 1 和 3.8 : 1。将免疫原以 50 μg /只免疫小鼠,3 次和 5 次免疫后小鼠血清效价达 1 : 16 000 及以上和 1 : 32 000 及以上,合成的人工抗原具有良好的免疫原性。本研究完成了 AOZ 人工抗原的合成,为 AOZ 单克隆抗体的制备和免疫学检测方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] 田娟娟,甘金华,彭 婕,等. 草鱼肌肉中呋喃唑酮代谢物 AOZ 检测能力验证样品的制备研究[J]. 淡水渔业,2018,48(5):3 - 10.
- [2] Lewkowski J, Rogacz D, Rychter P. Hazardous ecotoxicological impact of two commonly used nitrofurans - derived antibacterial drugs: furazolidone and nitrofurantoin[J]. Chemosphere,2019,222:381 - 390.
- [3] 付树林,邢丽红,孙伟红,等. 呋喃西林和呋喃唑酮在海参组织中的代谢消除规律[J]. 中国渔业质量与标准,2016,6(1):36 - 44.
- [4] 方双琪,张 帅,陈 艳,等. 不同抗生素参与下呋喃唑酮代谢物在鲫鱼体内的残留消除规律[J]. 现代食品科技,2021,37(1):276 - 281.
- [5] 邢丽红,孙伟红,孙晓杰,等. 液相色谱 - 串联质谱法测定大菱鲆鱼粉中呋喃唑酮代谢物残留[J]. 食品安全质量检测学报,

- 2020,11(18):6326 - 6333.
- [6] Melekhin A O, Tolmacheva V V, Shubina E G, et al. Determination of nitrofurans metabolites in honey using a new derivatization reagent, magnetic solid - phase extraction and LC - MS/MS[J]. Talanta, 2021,230:122310.
- [7] 王立博,邓 莉,张永辉,等. 荧光免疫层析试纸在水产品中呋喃唑酮代谢物快速检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2021,12(20):7952 - 7959.
- [8] 温丹华,高丽霞,史晓亚,等. 化学发光酶免疫法测定动物源性食品中呋喃唑酮代谢物的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019,10(7):2023 - 2032.
- [9] 石贤爱,裴世锋,李向楠,等. 基于不同半抗原的呋喃唑酮代谢物免疫检测方法的建立与比较[J]. 食品科学,2014,35(8):174 - 180.
- [10] 李 昊,韩 乐. 氯霉素人工抗原合成的优化及多克隆抗体的制备[J]. 中国食品学报,2013,13(5):177 - 184.
- [11] Sun Y N, Yang J F, Yang S Z, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk[J]. RSC Advances, 2018,8(17):9580 - 9586.
- [12] Li Z Z, Wang Y, Li D M, et al. Development of an indirect competitive enzyme - linked immunosorbent assay for screening ethopabate residue in chicken muscle and liver[J]. RSC Advances,2017,7(57):36072 - 36080.
- [13] 王 耀,曹金博,李铁梅,等. 盐酸可乐定人工抗原的合成及鼠源多抗血清 ELISA 鉴定[J]. 食品与机械,2021,37(7):76 - 80,111.
- [14] 李 敏. 动物性食品中呋喃唑酮代谢物残留酶联免疫检测方法研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.
- [15] 刘婷婷. 呋喃唑酮及其代谢物酶联免疫检测方法的研究[D]. 天津:天津科技大学,2010.
- [16] 黄种乾. 呋喃唑酮代谢物 AOZ 酶免疫分析方法研究[D]. 太原:山西大学,2016.
- [17] 宋 娟,王榕妹,王悦秋,等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J]. 分析化学,2010,38(8):1211 - 1218.
- [18] Goodrow M H, Hammock B D. Hapten design for compound - selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules[J]. Analytica Chimica Acta,1998,376(1):83 - 91.
- [19] 李容庆,权春善,张丽影,等. 人工抗原合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2018,38(12):65 - 75.
- [20] 安 静,古丽斯坦,宋 斌,等. 呋喃唑酮代谢物直接竞争化学发光检测方法的建立[J]. 分析仪器,2019(5):65 - 70.
- [21] Erlanger B F. The preparation of antigenic hapten - carrier conjugates;a survey[J]. Methods in Enzymology,1980,70:85 - 104.
- [22] 栗世婷. 磺胺二甲噻嘧啶完全抗原的合成和鉴定[J]. 药物生物技术,2017,24(4):294 - 298.