

呋喃西林代谢物半抗原的制备及其免疫检测中的应用

李斌^{1,2}, 俞思明³, 胡睿^{1,2}, 于淑娟¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (2. 广州润坤生物科技有限公司, 广东广州 510800)
(3. 暨南大学生物材料广东高校重点实验室, 生物医学工程系, 广东广州 510632)

摘要: 本研究为了克服现有 SEM 半抗原结构不含硝基端基团的不足, 将 SEM 与 4-(3-醛基-4-硝基-苯氧基)-丁酸衍生制备半抗原, 保留了硝基端基团。然后, 将制备的半抗原分别与 BSA 和 OVA 偶联制备 SEM-BSA 免疫原和 SEM-OVA 包被原。免疫原免疫 BALB/C 小鼠后, 结合细胞融合技术制备单克隆抗体, 并利用间接竞争酶联免疫分析法 (ciELISA) 评价单克隆抗体的效价及特异性。结果显示, 单克隆抗体可特异性识别 SEM 的 2-硝基苯甲醛衍生物 (2-NPSEM), 效价达 1:2560000。应用 ciELISA 检测法, 在 0.05~4.05 $\mu\text{g/L}$ 呈线性关系, 检测限高达 0.04 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 值为 0.23 $\mu\text{g/L}$, 与结构类似物 NPAMOZ、NPAOZ 和 NPAHD 的交叉反应率分别为 0.03%、0.02% 和 0.26%。本论文提供的 SEM 半抗原的设计和改造方法, 为呋喃西林的代谢物 SEM 的高效检测提供了新思路和方法。

关键词: 呋喃西林代谢物; 氨基脒; 单克隆抗体; 间接竞争酶联免疫分析法

文章编号: 1673-9078(2018)03-90-94

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.03.013

Preparation of Nitrofurazone Metabolite Hapten and Its Applications in Immunoassay

LI Bin^{1,2}, YU Si-ming³, HU Rui^{1,2}, YU Shu-juan¹

(1. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 501640, China)

(2. Guangzhou Runkwon Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou 510800, China)

(3. Key Laboratory of Biomaterials of Guangdong Higher Education Institutes, Department of Biomedical Engineering, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

Abstract: In the present work, a novel method for preparation of nitro-terminal group-containing SEM hapten was established by a reaction of SEM with 4-(3-aldehyde-4-nitro-phenoxy)-butyric acid s, which introduced a reactive terminal nitro groups into SEM structure. The prepared SEM hapten was then coupled with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) respectively to prepare SEM-BSA immunogen and SEM-OVA coating antigen. The BALB/C mice were immunized with immunogen SEM-BSA, and the monoclonal antibodies were prepared by cell cell fusion technology. The titer and specificity of the monoclonal antibodies were evaluated by using indirect competitive enzyme-linked immunoassay (ciELISA). The results showed that the prepared monoclonal antibody could specifically recognize the 2- nitrobenzaldehyde derivates (2-NPSEM) of SEM with a titer of 1:2560000. The established ciELISA method exhibited a good linear relationship in the range of 0.05~4.05 $\mu\text{g/L}$ with a detection limit of 0.04 $\mu\text{g/L}$ and a half maximal inhibitory concentration value (IC_{50}) of 0.23 $\mu\text{g/L}$, and the cross reaction rates of NPAMOZ, NPAOZ and NPAHD were 0.03%, 0.02% and 0.26%, respectively. This methods for SEM hapten synthesis provided new ideas and ways for the high-efficient detection of nitrofurazone metabolite.

Key words: nitrofurazone metabolites; semicarbazide; monoclonal antibody; indirect competitive enzyme linked immunoassay

呋喃西林属于硝基呋喃类药物, 近年来频繁用于

收稿日期: 2017-07-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271889)

作者简介: 李斌 (1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事小分子物质免疫检测研究

通讯作者: 于淑娟, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事制糖工程, 功能碳水化合物研究

水产类养殖和禽类养殖^[12]。硝基呋喃类药物进入动物体内后, 快速代谢为氨基脒 (Semicarbazide, SEM), 具有致畸、致突变和致癌作用^[3]。欧美和我国相继公布了禁止使用硝基呋喃类药物的法令, 并明确了其代谢物的最高残留量为 0.25 $\mu\text{g/L}$ ^[4]。

现阶段有关呋喃西林代谢物残留的检测技术主要有: 高效液相 (HPLC)、液相质谱 (LC-MS 或

LC-Ms/Ms)、高效气相(GC)、气相质谱(GC-Ms)和免疫分析技术。前四种技术主要是通过SEM与邻硝基苯甲醛过夜衍生后,用仪器测定其衍生物(2-NPSEM)^[5-7]。色谱技术的样本处理较繁琐费时,需昂贵的仪器设备,且需要专业分析人员操作,不适合大批量的样本筛查,无法满足现有市场的需求。酶联免疫分析技术作为一种快速、高灵敏度、高特异性的检测方法,正广泛应用于有毒、有害药物的残留检测。

免疫分析技术的关键是生物原材料(抗原、抗体)的制备,其性能决定了快检产品的质量。由于呋喃西林代谢物(SEM)分子量较小,只具有反应原性,免疫时必须与大分子载体偶联,制备成人工合成抗原后才能获得免疫原性,从而刺激动物机体产生特异性抗体^[8]。Cooper等^[9]用羧基苯甲醛制备了SEM衍生物的多克隆抗体,并建立了检测SEM残留的ELISA法,在鸡肉中的检测限为0.25 μg/L。李军平^[10]用3-羧基苯甲醛与SEM衍生制备了半抗原,通过偶联蛋白后免疫小鼠制备了单克隆抗体,其IC₅₀值为31.25 μg/L。任海涛^[11]等将4-(4-醛基苯氧基)-丁酸和4-(4-醛基苯氧基)-乙酸与SEM衍生合成半抗原,通过偶联蛋白后免疫小鼠制备了单克隆抗体,其IC₅₀值为12.37 μg/L。Huang Deng Yu等^[12]用4-羧基苯甲醛与SEM衍生制备了半抗原,通过偶联蛋白后免疫小鼠制备了单克隆抗体,其IC₅₀值为0.54 μg/L。现有文献报道合成的SEM半抗原结构都为传统的4-CP或3-CP衍生物结构,共同点是没有保留待测目标物硝基端的优势基团,导致制备获得的抗体存在特异性差、亲和力和低。

本文重点解决现有SEM半抗原结构不含硝基端优势基团的不足,提供一种新的呋喃西林代谢物SEM衍生半抗原及人工抗原的制备方法,获得具有高灵敏度和特异性的单克隆抗体,用于ciELISA法检测2-NPSEM的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要仪器

牛血清蛋白 BSA、卵清蛋白 OVA、弗氏完全与不完全佐剂,美国 sigma 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,上海杰一生物技术有限公司;2-NPSEM、氢氧化锂、呋喃西林代谢物、吐温-20,上海阿拉丁试剂公司;分析级 Na₂CO₃、NaHCO₃、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、KCl、浓硫酸和柠檬酸等,广州化学试剂有限公司;HRP 显色用的 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB),上海安耐吉化学有限公司;实验用水均

为 Milipore 超纯水;SPF 级 Balb/c 纯种雌性小鼠,广东省医学实验动物中心。

酶联免疫测定(ELISA)用溶液:磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)、碳酸盐缓冲液(CB, 0.05 mol/L, pH 9.6)、洗涤液(PBST, 0.01 mol/L, pH 7.4, PBS-0.05 mol/L 吐温 20)、封闭液(1% BSA-PBS)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物液(TMB-过氧化氢脲溶液)、终止液(10% H₂SO₄ 溶液)。

Multiskan MK3 酶标仪、Wellwash MK2 洗板机,美国 Thermo 公司;高速冷冻离心机、恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;恒温加热磁力搅拌器、磁力搅拌器、旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限责任公司。

1.2 半抗原合成

(1) 将 2.0 g (7.1 mmol) 的化合物 I 溶于 10 mL 乙醇中,通过 6 mol/L 的氢氧化锂溶液将化合物 I 的乙醇溶液调至 pH 值为 10~12,室温反应 15~26 h,加入 40 mL 纯化水,所得溶液通过 1 M 的稀盐酸调 pH 值至 4~5,过滤,烘干得到 1.1 g 的化合物 II。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, TMS): δ 10.50 (s, 1H), 8.20 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.15~7.19 (dd, 1H), 4.23 (t, 2H), 2.66 (t, 2H), 2.26 (m, 2H)。ESI-MS: 167 [M-CH₂CH₂CH₂COOH⁻], 252 [M⁻], 288 [M+2H₂O⁻], 315 [2×167-H₂O⁻], 505 [2M⁻], 537 [2M+MeOH⁻]。

(2) 将 0.5 g (即 2.0 mmol) 的化合物 II 溶解于 10 mL 甲醇中,加入 0.18 g (即 2.4 mmol) 的呋喃西林代谢物 SEM,于 60~70 °C 反应 2 h,反应完毕,冷却至室温,过滤,得 0.42 g 的呋喃西林代谢物的半抗原。半抗原合成路线图如图 1 所示:

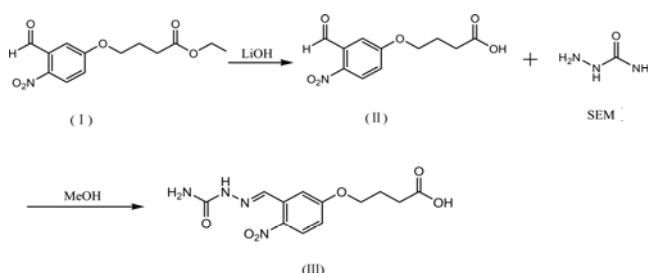


图 1 半抗原的合成路线图(式 III 为合成的半抗原)

Fig.1 Synthetic route of SEM haptens (III was the synthesized haptens)

1.3 人工抗原合成

人工抗原采用活泼酯法制备,将式 III 半抗原在碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)作用下与载体蛋白上的氨基偶联,合成示意图如图 2 所示:

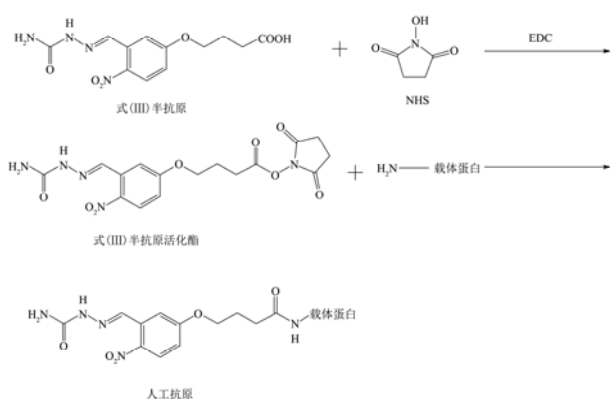


图2 人工抗原合成示意图

Fig.2 Synthetic route of artificial antigen

本文所制备的人工抗原包括免疫原与包被原，两者的不同之处在于制备过程中偶联的载体蛋白种类不同，免疫原通过半抗原与牛血清蛋白（BSA）偶联制备（式(III)-BSA），包被原通过半抗原与卵清蛋白（OVA）偶联制备（式(III)-OVA）。具体合成步骤如下：

(1) 取 10.0 mg 式III半抗原，溶解于 0.5 mL 二甲基甲酰胺（DMF）中，搅拌充分后，加入 8.0 mg 的碳二亚胺（EDC）和 6.0 mg 的 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS），室温下搅拌 4 h，即可得到半抗原活化酯；

(2) 称取 70.9 mg BSA（或 43.0 mg OVA）（式III半抗原与 BSA 和 OVA 的摩尔比均控制在 30:1），使其充分溶解在 4 mL 的浓度为 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中，形成载体蛋白溶液，在搅拌下将半抗原活化酯逐滴缓慢滴加至载体蛋白溶液中，并在室温下搅拌 24 h；

(3) 步骤（2）制得的溶液用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液室温透析 3 d，每天换 3 次透析液，以除去未反应的小分子物质；

(4) 分装，于 4 °C 保存备用。

1.4 单克隆抗体的制备

将制备的免疫原式(III)-BSA，与等体积弗氏佐剂乳化后，免疫 BALB/C 小鼠。每只小鼠免疫剂量为 50~100 μg，免疫间隔 3 周，免疫 3 次后，采小鼠尾部静脉血检测血清效价。如抗血清效价不达标 100000，需加强免疫，待抗体效价不再升高后，以 100 μg 免疫原进行皮下加强免疫，5 d 后取小鼠的脾细胞与 SP20 细胞融合。融合后的细胞在 HAT 培养基中筛选，5 d 后以完全培养基替换成 HAT 培养基进行培养。用 ciELISA 对细胞上清进行检测，将检测结果为强阳性的孔内细胞进行有限稀释法克隆培养，经 3 次克隆培养检测后，均呈阳性的孔内细胞即为分泌单克隆抗体

的杂交瘤细胞。将杂交瘤细胞放大培养后，接种至小鼠腹腔，产生含抗体的腹水。用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水，即可得到高纯度、高特异性的单克隆抗体。

1.5 单克隆抗体的效价及特异性测定

用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液作包被稀释液，将合成的免疫原式(III)-OVA 按预试 0.5 μg/mL 的浓度包被酶标板，将纯化好的单克隆抗体按 1:20000、1:40000、1:160000、1:320000、1:640000、1:1280000、1:2560000 倍稀释，用 ciELISA 法测定单克隆抗体效价和特异性。选择效价高且抑制率好的抗体浓度，根据方阵滴定法以 450 波长下的 OD 值在 2.0 左右的稀释浓度作为抗 2-NPSEM 单克隆抗体的工作浓度，将呋喃西林代谢物 SEM 的衍生物标准品配制成浓度为 0、0.05、0.15、0.45、1.35 和 4.05 μg/L 的系列标准品溶液，建立 ciELISA 法标准曲线^[13]。通过测定 20 个 0 μg/L 标准液，计算 OD 值的平均值和标准差，根据最低检测限公式 $Z = \text{平均值} - 3 \times \text{标准差}$ ，在标准曲线上的 Z 值（即 Y 值）对应的浓度即为标准品最低检测限值^[14]。

将 SEM 结构类似物呋喃它酮、呋喃唑酮和呋喃妥因代谢物的衍生物，按上述方法获得 ciELISA 标准曲线，计算其半抑制浓度 IC_{50} 值，并计算其与 SEM 的交叉反应率。

2 结果

2.1 半抗原的结构鉴定

半抗原的核磁共振氢谱和质谱表征结果分别如图 3(a) 和图 3(b) 所示。核磁共振氢谱结果为：¹H NMR (600 MHz, DMSO, TMS): δ 12.17 (s, 1H), 10.61 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.03 (d, 1H), 7.12 (dd, 1H), 6.68 (s, 2H), 4.21 (s, 2H), 2.44 (t, 2H), 2.03 (m, 2H)。质谱结果为 ESI-MS: 311 [M⁺]。以上结果表明，本文设计的半抗原被成功合成，且半抗原结构中含有末端羧基，能够用于人工完全抗原合成。

2.2 人工抗原的结构鉴定

人工抗原利用紫外光谱法进行分析鉴定^[15]，紫外图谱如图 4 所示，其中半抗原、BSA 和 OVA 的紫外图谱作为对照。从图 4 中可看出，BSA 在 280 nm 处有特征吸收，式III半抗原在 265 nm 处有强的特征吸收。式(III)-BSA 完全抗原在 260 nm 左右出现一个宽的吸收峰，相对于式III半抗原吸收峰有所蓝移，且未见 BSA 蛋白的特征吸收，这是因为式III半抗原与 BSA 发生共价偶联所致。同样的，式(III)-OVA 在 265 nm 处出现宽

的吸收峰,且相对于式III半抗原和OVA,吸收峰有所蓝移,说明式III半抗原与OVA成功偶联。综上所述,免疫原式(III)-BSA和包被原式(III)-OVA被成功合成。

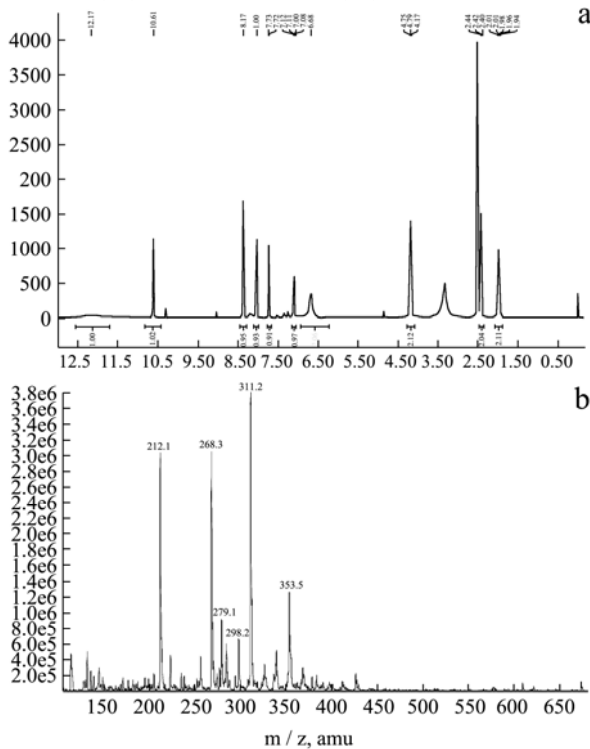


图3 半抗原的核磁共振氢谱图(a)和质谱图(b)

Fig.3 ¹H NMR spectrum (a) and mass spectrum of hapten (b)

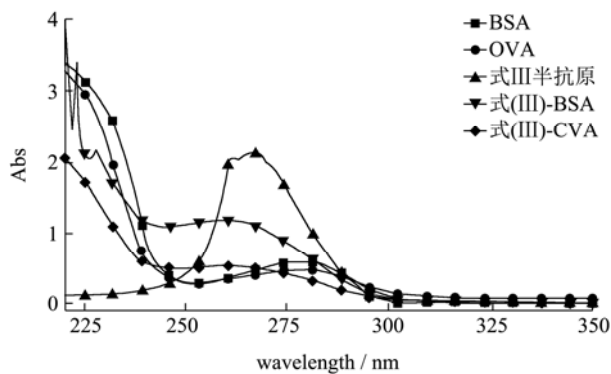


图4 BSA、OVA、式III半抗原以及免疫原式(III)-BSA和包被原式(III)-OVA的紫外图谱

Fig.4 UV-Vis spectra of BSA, OVA, III-hapten, immunogen SEM-BSA (III) and coating antigen SEM-OVA(III)

2.3 单克隆抗体效价检测

第三次免疫BALB/C小鼠后,结合细胞融合技术制备的单克隆抗体的效价如表1所示,结果表明包被原式(III)-OVA对应的抗体效价为1:2560000。

表1 抗2-NPSEM单克隆抗体效价

Table 1 Anti 2-NPSEM monoclonal antibody titer

| | | | | | |
|--------|---------|---------|---------|----------|----------|
| 血清稀释倍数 | 1:20000 | 1:40000 | 1:80000 | 1:160000 | 1:320000 |
|--------|---------|---------|---------|----------|----------|

2.4 单克隆抗体的灵敏度和特异性的ciELISA

法检测结果

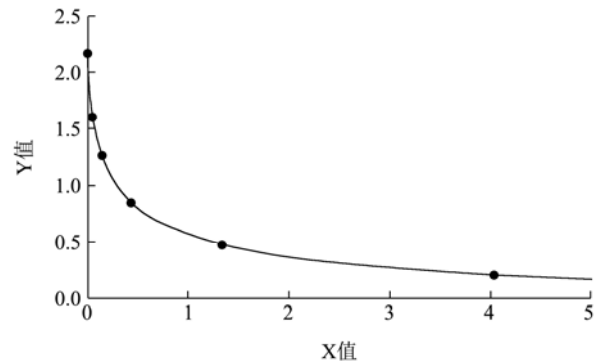


图5 SEM衍生物ciELISA法标准曲线

Fig.5 Calibration curve of SEM derivatives by ciELISA method

本文利用ciELISA法对制备的单克隆抗体的灵敏度和特异性进行了测定分析。在ciELISA法中,对不同SEM衍生物浓度的OD值以及B/B₀(不同浓度的标准品测试孔OD值与含量为0的标准品测试孔OD值的比值)进行了测定,结果如表2所示。从表2中可看出,当呋喃西林代谢物SEM的衍生物含量为0.05 μg/L时,其B/B₀值为73.44%,说明其检测OD与含0 μg/L浓度的呋喃西林代谢物SEM的衍生物测试孔OD值有明显差异。

通过表2数据,采用ELISA Calc软件进行四参数Logistic曲线拟合绘制标准曲线(图5),线性方程为: $y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D$, $R^2=0.9998$, $A=2.15892$, $B=0.64857$, $C=0.28492$, $D=-0.14724$, x 表示待测物浓度, y 表示OD值,计算得到IC₅₀值为0.23 μg/L,在0.05~4.05 μg/L呈线性关系。通过测定20个0 μg/L标准液,按公式 $Z=平均值-3$ 标准差,计算出了Z值为1.6484,把Z值做为Y值代入标准曲线即可算出最低检测限为0.04 μg/L。

| | | | | | |
|----------------------|----------|-----------|-----------|-------|-------|
| OD _{450 nm} | 2.734 | 2.298 | 1.635 | 1.109 | 0.768 |
| 血清稀释倍数 | 1:640000 | 1:1280000 | 1:2560000 | 阴性对照 | 空白 |
| D _{450 nm} | 0.427 | 0.274 | 0.164 | 0.049 | 0.041 |

表2 ciELISA 法测试不同浓度 SEM 衍生物标准品的 OD 值及 B/B₀ 值Table 2 OD and B/B₀ value of different concentrations of SEM derivate standards by ciELISA method

| SEM 衍生物浓度/(μg/L) | 0 | 0.05 | 0.15 | 0.45 | 1.35 | 4.05 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| OD 值 | 2.1605 | 1.5866 | 1.2505 | 0.8439 | 0.4524 | 0.2103 |
| B/B ₀ | 100% | 73.44% | 57.88% | 39.06% | 20.94% | 9.74% |

以相同方法对抗血清的交叉反应性进行测定,对结构类似物 NPAM0Z、NPA0Z 和 NPAHD 的交叉反应率分别为 0.03%、0.02%和 0.26%,结果表明该抗血清对其他三种硝基呋喃代谢衍生物均无交叉反应,特异性良好。

3 讨论

3.1 免疫检测技术的关键是获得性能优良的人工合成抗原和抗体,而抗体的效价和特异性取决于人工合成抗原的结构和活性。现有文献报道的呋喃西林代谢物 SEM 抗原的常用方法是将其改造为具有 4-CP 或 3-CP 衍生物结构的半抗原,然后偶联蛋白制备完全抗原。此种方法共同点是半抗原结构改造时没有保留待测目标物的优势基团硝基端,导致制备获得的抗体存在特异性差、亲和力低。如李军平^[10]用 3-羧基苯甲醛与 SEM 衍生制备了半抗原,通过偶联蛋白后免疫小鼠制备了单克隆抗体,其 IC₅₀ 值仅为 31.25 μg/L。因此,探索一种新的合成方法,对呋喃西林代谢物 SEM 结构进行合理衍生化改造,保留其优势基团硝基端,对于获得高效价的抗体及建立高效的 ciELISA 法检测呋喃西林代谢物 SEM 极为关键。

3.2 本实验以呋喃西林代谢物 SEM 为模型,4-(3-醛基-4-硝基-苯氧基)-丁酸为衍生手臂,合成了一种新型 SEM 半抗原,偶联载体蛋白后,通过 Balb/c 免疫,成功制备了对 2-NPSEM 有较好识别作用的单克隆抗体。本实验的半抗原与传统的 4-CP 或 3-CP 衍生化半抗原相比,具有明显优势。半抗原引入的手臂不仅具有活性基团,还完整保留了待测目标物的硝基端,使得半抗原与待测目标物的电子云密度一致,有效提高了小分子半抗原的免疫原性,提高了抗体质量。

参考文献

[1] Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis [J]. Veterinarni Medicina, 2008, 53(9): 469-500

[2] Samsonova J, Douglas A, Cooper K M, et al. The identification of potential alternative biomarkers of

nitrofurazone abuse in animal derived food products [J]. Food and Chemical Toxicology 2008, 46(5): 1548-54

[3] Jia Q, Yu S, Cheng N, et al. Stability of nitrofurantoin residues during honey processing and nitrofurantoin removal by macroporous adsorption resins [J]. Food Chemistry, 2014, 162(6): 110-6

[4] 农业部公告 781-4-2006,动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定[S].
Announcement No.781-4-2006 of the Ministry of Agriculture, Determination of metabolite residues of furans in animal derived foods [S]

[5] 张平安,张建威,乔明武,等.高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中硝基呋喃代谢物的研究[J].浙江农业科学,2010,1(3):611-614
ZHANG Ping-an, ZHANG Jian-wei, QIAO Ming-wu, et al. Determination of metabolites of nitrofurantoin antibiotics in honey by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2010, 1(3): 611-614

[6] Pereira A, Pampana L, Donato J, et al. Analysis of nitrofurantoin metabolic residues in salt by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 514: 9-13

[7] Mottier P, Khong S-P, Gremaud E, et al. Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067: 85-91

[8] 潘孝成,祁克宗,孙国仁,等.兽药单克隆抗体研究进展[J].动物医学进展,2005,26(4):31-33
PAN Xiao-cheng, QI Ke-zong, SUN Guo-ren, et al. Progress on monoclonal antibodies of veterinary drug [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(4): 31-33

[9] Cooper K M, Samsonova J V, Plumpton L, et al. Enzyme immunoassay for semicarbazide-The nitrofurantoin metabolite and food contaminant [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 592: 64-71

- [10] 李军平.抗呋喃西林代谢物衍生物单克隆抗体的研制及其ELISA检测方法的建立[D].扬州:扬州大学,2008
LI Jun-ping. Development of Monoclonal antibody against derivant of nitrofurals metablite and establishment of its ELISA detection [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2008
- [11] 任海涛,沈玉栋,徐振林,等.呋喃西林代谢物多克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法[J].食品工业科技,2012,33(5): 330-333
REN Hai-tao, SHEN Yu-dong, XU Zhen-lin, et al. Production and identification of polyclonal antibody detect nitrofurazone metabolite and development of enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(5): 330-333
- [12] Huang D, Gao L, Li Y, et al. Determination of nitrofurazone metabolite in animal-derived food by indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2017, 8: 402-10
- [13] 贾慧勤,丁焕中,刘晓云,等.呋喃唑酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备[J].中国兽药杂志,2013,47(6):20-23
JIA Hui-qin, DING Huan-zhong, LIU Xiao-yun, et al. Synthesis of artificial antigens and preparation of specific antisera against 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of furazolidone [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(6): 20-23
- [14] 杨利国,胡少昶,魏平化,等.酶免疫测定技术[M].南京:南京大学出版社,1988
YANG Li-guo, HU Shao-chang, WEI Ping-hua, et al. Enzyme immunoassay technology [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1988
- [15] Ruwona T B, Johnson V J, Hettick J M, et al. Production, characterization and utility of a panel of monoclonal antibodies for the detection of toluene diisocyanate haptenated proteins [J]. Journal of Immunological Methods, 2011, 373(1-2): 127-35