

# 恩诺沙星抗体免疫检测及其分子识别机制研究

张秀媛, 何扩, 黄智鸿, 陈一, 王丽霞, 赵瑞平

(河北北方学院农林科技学院, 河北北方学院食品安全研究中心, 河北张家口 075000)

**摘要:** 兽药恩诺沙星对人体具有较强的毒副作用, 检测恩诺沙星残留对保障食品安全具有重要的作用。本研究将恩诺沙星与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物注射免疫 BALB/c 小鼠制备恩诺沙星单克隆抗体, 并建立基于单克隆抗体的酶联免疫法检测样品羊奶中恩诺沙星的方法。将筛选出的杂交瘤细胞注射小鼠提取腹水, 并以此单克隆抗体建立直接竞争 ELISA 方法。其半数抑制率( $IC_{50}$ )为  $0.71 \pm 0.05$  ng/mL, 最低检测限( $IC_{15}$ )为  $0.04 \pm 0.02$  ng/mL。检测羊奶样品含恩诺沙星在 10~200 ng/mL 时回收率为 96.56~105.10%, 且与 HPLC 法检测呈良好线性关系( $R^2=0.9998$ )。最后利用计算机生物信息学构建恩诺沙星抗体的可变区三维结构并与抗原进行分子对接。结果显示 Arg98、Asp99、Gly101、Thr50、Ser51、Ala82、Tyr85 等氨基酸残基在抗体抗原识别过程中起关键作用。这些信息对今后抗体结构修饰具有理论指导意义。

**关键词:** 恩诺沙星; 单克隆抗体; 酶联免疫反应; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2015)6-284-289

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.6.045

## Immunodetection and Molecular Recognition Mechanism of Antibodies against Enrofloxacin

ZHANG Xiu-yuan, HE Kuo, HUANG Zhi-hong, CHEN Yi, WANG Li-xia, ZHAO Rui-ping

(College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University; Food Safety Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** Enrofloxacin (ENR) is a veterinary drug with strongly toxic side effects in humans. Therefore, the detection of ENR in food has important implications for food safety. Anti-ENR monoclonal antibody (mAb) was prepared by immunizing BALB/c mice with conjugates of ENR and bovine serum albumin (BSA). The resulting monoclonal antibody was used to establish a direct competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) to detect ENR in goat milk samples. The limit of the detection ( $IC_{15}$ ) was  $0.04 \pm 0.02$  ng/mL and half inhibition rate ( $IC_{50}$ ) was  $0.71 \pm 0.05$  ng/mL. The recovery rates were 96.56% to 105.10% when ENR concentrations were between 10 and 200 ng/mL in goat milk. ELISA and high-pressure liquid chromatography (HPLC) showed a good linear correlation ( $R^2=0.9998$ ). Finally, the 3-dimensional (3D) structure of the ENR antibody variable region was modelled and docked using computer bioinformatics. The results showed that Arg98, Asp99, Gly101, Thr50, Ser51, Ala82, and Tyr85 performed key functions during antibody-antigen recognition. The results of this study provide theoretical guidance for future antibody structure modifications.

**Key words:** enrofloxacin; monoclonal antibody; enzyme-linked immunoabsorbent assay; molecular docking

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)又名乙基环丙沙星, 是动物饲养过程中专用的一种广谱性抗菌药。目前该药被国家指定为动物专用药, 广泛用于禽畜水产养殖业中的疾病治疗与预防。恩诺沙星可引起幼畜轻度软组织损伤和关节炎等毒副作用, 长期大量使用会使病菌产生耐药性, 且有潜在的致癌作用。人类如果长期食用带有恩诺沙星残留的食品, 会引起皮肤炎, 导致

收稿日期: 2015-01-25

基金项目: 张家口市科技攻关重点项目(13110180-3)

作者简介: 张秀媛(1982-), 女, 讲师, 研究方向: 食品安全与营养

通讯作者: 黄智鸿(1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品污染物检测

头痛、失眠、神经过敏, 引起精神病症状等<sup>[1]</sup>。

目前, 世界上很多国家都相应制定了食品中恩诺沙星的残留量。欧盟2377/90号条例规定恩诺沙星最大残留量为30  $\mu\text{g/L}$ , 美国FDA于2005年宣布禁止恩诺沙星用于家禽, 我国农业部颁布235号公告规定恩诺沙星在肌肉和脂肪组织的最大残留量为100  $\mu\text{g/L}$ 。因此, 建立和研究食品中恩诺沙星高效、特异、灵敏的检测方法是非常必要的。常规方法用于检测恩诺沙星的方法有色谱法, 紫外分光光度法, 生物学方法等, 这些方法由于前处理费时费力、设备昂贵等缺点, 酶联免疫检测法(ELISA)是一种简便、快速、灵敏且能批量测定恩诺沙星残留的方法<sup>[2]</sup>。

恩诺沙星是小分子抗原,无免疫原性只具有免疫反应性,抗体在制备过程中,要想获得高亲和力抗体,小分子抗原的结构改造是关键,目前蛋白质库(PDB Bank)中没有恩诺沙星抗体蛋白结构的解析也未见抗原抗体识别机制研究的文献报道。因此对恩诺沙星抗体与其抗原反应机制了解有限。多数情况下小分子免疫抗原的合成误差性大,最终大大降低抗体的亲和力。本研究首先制备了高特异性恩诺沙星单克隆抗体。然后利用杂交瘤分子克隆技术首次构建了恩诺沙星单链抗体(scFv),最后利用计算机生物信息技术构建恩诺沙星抗体单链抗体的三维结构,将构建的单链抗体结构与恩诺沙星小分子抗原进行分子对接,为今后恩诺沙星抗体体外亲和力成熟技术奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

恩诺沙星、司帕沙星、洛美沙星、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星、二氟沙星(纯度 $\geq 99\%$ ),中国兽药监察所;牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂,美国Sigma公司;石蜡油、TMB, Biosharp公司;羊抗兔酶标二抗(IgG-HRP),北京博奥森生物技术有限公司;培养基、PEG1500,均为Gibco公司;羊奶,张家口当地超市;内切酶EcoR I、Xho I和T4 DNA连接酶, TaKaRa公司; GoScript反转录系统与其它试剂盒, Promega公司。

### 1.2 主要仪器与设备

酶标仪,美国thermo公司;加热磁力搅拌器-RH-KT,美国IKA公司;UV-2550紫外可见分光光度计、高效液相色谱,日本岛津公司;冷冻离心机-5804R,德国Eppendorf公司;倒置生物显微镜,德国LEICA公司;CO<sub>2</sub>细胞培养箱,美国Precision公司;2400型PCR扩增仪,美国PE公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 动物免疫

参考刘兵<sup>[5]</sup>等方法,采用混合酸酐法制备人工抗原 ENR-BSA,以 ENR-BSA 为免疫原,按照 100  $\mu\text{g}$  免疫原、200  $\mu\text{L}$  乳化液/只小鼠(7~8 周龄,雌性, Balb/c),进行初次免疫。两周后,同样剂量加强免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,之后进行 3 次免疫。在每次免疫后 8~10 d,在尾动脉处取血,检测小鼠血清效价、特异性。选择效价高、特异性高的小鼠进行冲刺免疫。冲刺剂量为免疫原 200  $\mu\text{g}$ , 200  $\mu\text{L}$  混合液(免疫原与

生理盐水的混合液),冲刺免疫后三天进行细胞融合<sup>[6,7]</sup>。

#### 1.3.2 细胞融合、克隆化及抗体制备

细胞融合、克隆化参照文献<sup>[2]</sup>的方法。将克隆化后的杂交瘤细胞( $0.8\sim 1\times 10^6$ )注入小鼠体内,7~10 日左右收集腹水,收集的腹水采用辛酸-硫酸铵法进行初纯,最后采用 Protein A 亲和柱对腹水二次纯化。二次纯化后的抗体与恩诺沙星类似物进行交叉反应测定<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.3 标准曲线的建立

采用直接竞争 ELISA(dc-ELISA)建立标准曲线,通过优化条件最终确定抗体包被浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,酶标抗原 NER-HRP 的稀释倍数为 1:8 000,以 0.5% 脱脂乳粉作为封闭液,将恩诺沙星标样从 200 ng/mL 开始往下 5 倍梯度稀释 7 个浓度,以恩诺沙星浓度为 X 轴,以加入恩诺沙星的吸光度 B 与不含恩诺沙星的吸光度 B<sub>0</sub> 的比值 B/B<sub>0</sub> 为 Y 轴绘制标准曲线。

#### 1.3.4 羊奶样品检测

##### 1.3.4.1 样品基质影响消除

取 1 mL 羊奶加到 2 mL 7.5% 的三氯乙酸溶液中,充分混匀 5 min, 5000 r/min 离心 30 min, 丢弃上层油脂,上清用 0.01 M PBS(pH 7.4)稀释 50 倍后用于 ELISA 分析。将获得的基质抑制率曲线与相应的标准曲线比较。

##### 1.3.4.2 样品测定

将 12 mL 羊奶平均分成 6 份,一份作为空白对照,其余 5 份添加恩诺沙星,添加量为终浓度分别为 200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL 5 个不同的量。按 1.3.5.1 方法处理后采用 ELISA 测定。

#### 1.3.5 VH、VL 及 scFv 基因扩增

从筛选的杂交瘤细胞中提取总 RNA,利用反转录试剂盒进行反转录合成第一链 cDNA,以 cDNA 为模板,以设计的 VH、VL 的前后游引物<sup>[10]</sup>进行 PCR 扩增 VH 和 VL 基因。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 30 个循环; 65  $^{\circ}\text{C}$  10 min。以 VH 和 VL 进行重叠延伸 PCR 合成 scFv。PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

#### 1.3.6 酶切、连接、转化

将纯化后的 scFv 与质粒 pET-26b 用内切酶 EcoR I 和 Xho I 进行酶切处理,37  $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 4 h。之后利用 TIANGEN-PCR 回收试剂盒对酶切后的片段和载体进行回收, T4 连接酶 16  $^{\circ}\text{C}$  连接 16 h, 转化入感受态细胞 JM109 菌,涂板,37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养过夜。挑选阳性克隆验证与测序。

### 1.3.7 scFv 蛋白的表达与活性检测

将提取的重组质粒 scFv-pET26b 化转入大肠杆菌 BL21 化学感受态中, 挑取上步平板中生长的克隆, 即 scFv-pET26b-BL21 菌株, 接种于 LB 中培养。转天菌液 OD<sub>600</sub> 达到 0.8~1.0 左右时用 IPTG 诱导 5 h。诱导的蛋白经 SDS-PAGE 检测后用镍钛柱纯化后按照本文 1.3.4 方法进行活性检测。

### 1.3.8 恩诺沙星抗体可变区同源建模

恩诺沙星抗体可变区结构采用 ExPASy 系统中的 SOMPA 软件分析其二级结构组成, 利用 SwissModel 软件进行恩诺沙星抗体可变区结构模板搜索。然后以搜索得到的模板为基础采用 Modeller4.0 软件进行可变区三维空间结构同源建模, 构建好的恩诺沙星抗体可变区三维结构采用 Errat 软件进行模型验证评价。

### 1.3.9 分子对接

利用分子对接软件 Discovery Studio 将构建的恩诺沙星抗体可变区三维结构模型与恩诺沙星小分子进行分子对接, 首先用 ChemDraw 软件画出恩诺沙星分子结构, 再用 ChemDraw3D 软件将其转换为 pdb 文件格式后正式用于对接, 对接过程中按照软件操作说明对模型进行预处理, 设置球活性位点半径 9, 其他参数设定为默认值<sup>[11]</sup>。

### 1.3.10 数据分析

采用 SPSS 软件进行数据处理分析, 试验数据均以 M±SD 表示。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 恩诺沙星单克隆抗体纯化

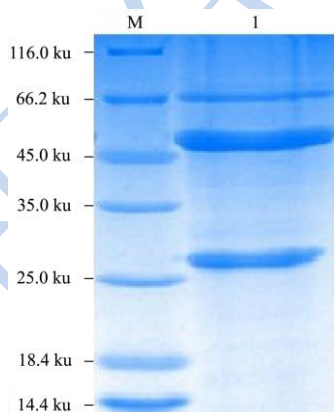


图1 恩诺沙星单克隆抗体的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.1 The SDS-PAGE image of anti-ENR mAb

经辛酸-硫酸铵法初步纯化的抗体, 利用 Protein A 亲和柱再次进行二次纯化, 二次纯化后的抗体利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行鉴定, 蛋白电泳结果见图2。图中可以看出抗体具有较好的纯度。其中一

条带约为 50 kDa 大小为重链。另一条约为 27 kDa 大小的为轻链。最上方是轻链形成的二倍体的条带。

### 2.2 恩诺沙星单克隆抗体交叉反应

表1 恩诺沙星单克隆抗体与恩诺沙星和其它类似物交叉反应

Table 1 Cross reactions (CRs) of mAb with ENR and other bactericide analogues

化合物名称	IC <sub>50</sub> /(ng/mL)	交叉反应/%
恩诺沙星	0.73±0.01	100
斯帕沙星	129.08±0.14	0.57
洛美沙星	122.33±0.38	0.60
环丙沙星	17.81±0.21	4.10
诺氟沙星	42.97±0.33	1.70
氧氟沙星	31.08±0.41	2.30
培氟沙星	72.32±0.27	1
二氟沙星	91.24±0.09	0.80

测定恩诺沙星单克隆抗体与其他恩诺沙星类似物兽药的交叉反应率见表1。由表1可知恩诺沙星单抗对恩诺沙星具有很强的识别能力, 与其他恩诺沙星类药物交叉反应较小, 表明制备的恩诺沙星单克隆抗体对恩诺沙星比较专一, 可以应用于监测恩诺沙星。

### 2.3 标准曲线的建立

经优化确定恩诺沙星单克隆抗体包被浓度为 0.5 μg/mL, 酶标抗原 ENR-HRP 的稀释倍数为 1:8000, 以 0.5% 脱脂乳粉作为封闭液, 以恩诺沙星浓度作为 X 轴, 以加入恩诺沙星的吸光度 B 与不含恩诺沙星的吸光度 B<sub>0</sub> 的比值 B/B<sub>0</sub> 为 Y 轴绘制标准曲线, 标准曲线见图2, 该标准曲线的半数抑制率为 IC<sub>50</sub>=0.71±0.05 ng/mL; 最低检测限为 IC<sub>15</sub>=0.04±0.02 ng/mL。

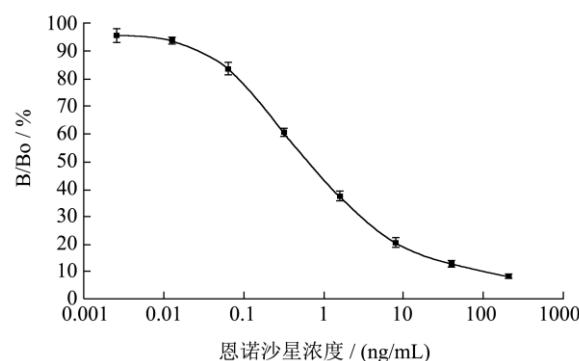


图2 恩诺沙星直接竞争 ELISA 标准曲线

Fig.2 The standard curve for the direct competitive ELISA of ENR

### 2.4 羊奶样品检测

#### 2.4.1 样品基质影响消除

样品基质影响消除结果见图4。从图中可以看出基质抑制率曲线相应的标准曲线是基本重合的。最终确定的羊奶样品的处理方法为：取 1 mL 羊奶加到 2 mL 7.5% 的三氯乙酸溶液中，充分混匀 5 min，5000 r/min 离心 30 min，丢弃上层油脂，上清用 0.01 M PBS (pH 7.4) 稀释 50 倍后再用于 ELISA 分析。

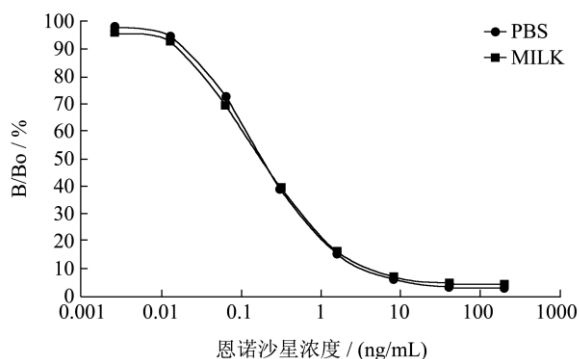


图3 以羊奶提取液为溶剂恩诺沙星的标准抑制率曲线

Fig.3 Standard inhibition curve of the ELISA for ofloxacin in blank goat milk

### 2.4.2 羊奶样品检测

在空白羊奶中添加 200 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、20 ng/mL、10 ng/mL 五个不同含量的恩诺沙星标准品，提取后采用上述 dc-ELISA 方法检测同时用 HPLC 方法<sup>[12]</sup>检测验证。结果见表 2。从表中可以看出在上述恩诺沙星含量之间 ELISA 法回收率为 96.56~105.10%。ELISA 法与 HPLC 法相关系数  $R^2=0.9998$ ，说明利用该单克隆抗体检测恩诺沙星可靠。

表 2 ELISA 和 HPLC 法检测恩诺沙星的回收率

Table 2 Recovery of ENR determined by the developed ELISA and HPLC

添加浓度 / (ng/mL)	检测浓度 / (ng/mL)		回收率 / %	
	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
200	197.80±0.06	201.75±0.03	98.90	100.90
100	97.70±0.10	101.30±0.10	101.30	101.30
50	48.28±0.21	49.35±0.20	96.56	98.70
20	21.03±0.18	20.56±0.14	105.20	102.80
10	10.09±0.28	9.98±0.21	100.90	99.80

### 2.5 VH、VL 和 scFv 片段扩增

以杂交瘤细胞中提取的总 RNA 为模板，通过反转录获得第一链 cDNA，以 cDNA 为模板，利用设计片段的前后引物扩增 VH 和 VL，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 4a，扩增的 VH 片段大小 340 bp 左右，扩增的 VL 片段大小约为 320 bp。scFv 基因扩

增结果见图 4b，片段大小为 750 bp，与预期结果相符。

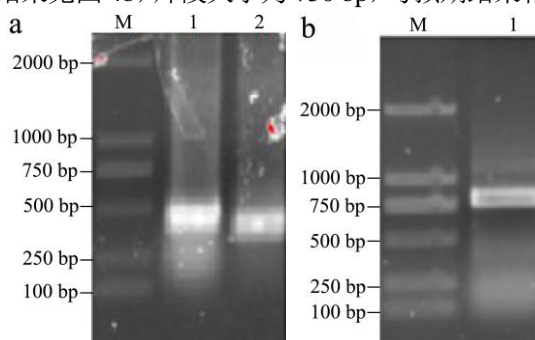


图4 恩诺沙星抗体的 VH、VL 和 scFv 片段的 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of VH, VL and scFv regions of the mAb

注：a：M：D2000 marker；1：恩诺沙星抗体 VH 片段；2：恩诺沙星抗体 VL 片段，b：M：D2000 marker；1：恩诺沙星抗体 scFv 片段。

### 2.6 重组质粒的验证与测序

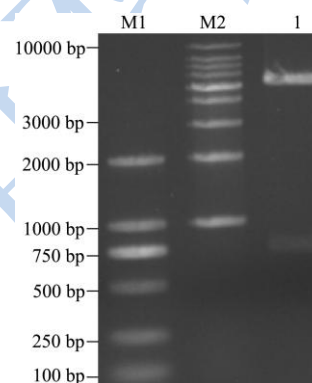


图5 恩诺沙星重组质粒酶切验证

Fig.5 Enzyme-digested products of the plasmid

注：M1：D2000 marker；M2：D10000 marker；1：Enzyme digested products.

VH  
 QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYFTFTYWIHWVKRPGQGLEWIGNINLSGKT  
 H-CDR1 H-CDR2  
 NYNEKFKNAKATLTVDTSSITAYMHLSSLTSEDSAVYHRCARDPGNYWGQGITVTVSS  
 H-CDR3  
 VL  
 DIELTQSPAIMSASLGEEITLCSASSVSYMHWYQKSGTSPKLWIYDTSKLASGVPARF  
 L-CDR1 L-CDR2  
 SSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLEIKR  
 L-CDR3

图6 VH 和 VL 的序列与分区

Fig.6 The sequence and partition of VH and VL regions of the mAb

对重组质粒进行双酶切验证，使用内切酶 EcoR I 和 Xho I 进行酶切处理，37 °C 条件下反应 4 h，凝胶电泳如图 5 所示。从结果可以看出有约 750 bp 单一条带被切下，证明片段已成功插入质粒，重组成功。测序与分区结果见图 6。

### 2.7 scFv 蛋白的表达与活性检测

经 SDS-PAGE 实验结果如图 7 所示。与诱导前相比, 诱导后和纯化后的蛋白中明显出现了大小约为 30 kDa 左右大小的条带, 表明目的单链抗体蛋白可在大肠杆菌 BL21 中成功表达。纯化后的 scFv 活性检测结果见图 8。其  $IC_{50}=0.90\pm 0.07$  ng/mL, 最低检测限为  $IC_{15}=0.09\pm 0.03$  ng/mL。

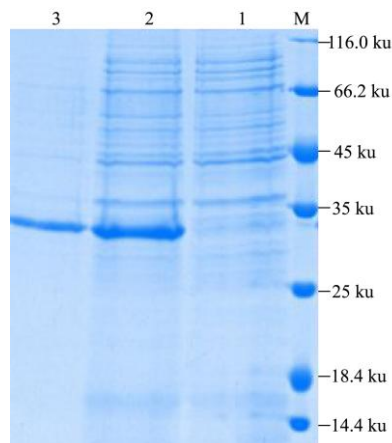


图 7 恩诺沙星 scFv 的诱导表达蛋白电泳

Fig.7 scFv-induced expression of protein electrophoresis

注: M: 蛋白marker; 1: 未诱导菌液; 2: 诱导后菌液; 3: 纯化后的诱导菌液。

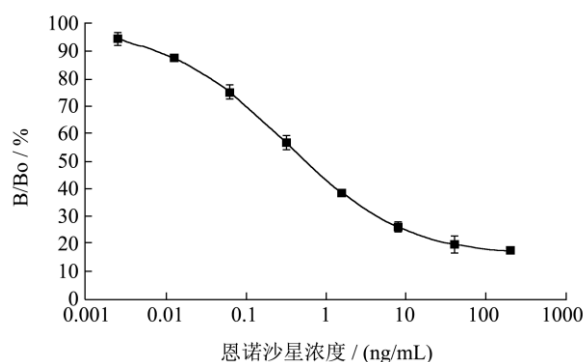


图 8 恩诺沙星 scFv 直接竞争 ELISA 标准曲线

Fig.8 The standard curve for direct competitive ELISA of ENR scFv

### 2.8 恩诺沙星抗体可变区空间结构预测

采用 SwissModel 软件进行模板搜索, 1QOK 作为同源建模的模板分子, 采用 Modeller 进行可变区空间结构建模, 结果恩诺沙星抗体可变区三维结构见图 9a 所示。其三维结构由 VL、VH 和 Linker 三部分组成, 符合典型 scFv (可变区) 的三维结构。该三维结构含  $\alpha$  螺旋 16 处;  $\beta$  折叠 86 处;  $\beta$  转角 20 处; 随机卷曲 99 处。采用 Errat 软件对三维结构合理性进行评价, 得到的评价和模型见图 9b 所示。该建模的恩诺沙星抗体可变区结构综合得分为 89.092 分, 根据软件规则得分 85 以上即为优秀。以上结果表明, 构建获得的恩诺

沙星抗体可变区三维结构合理。

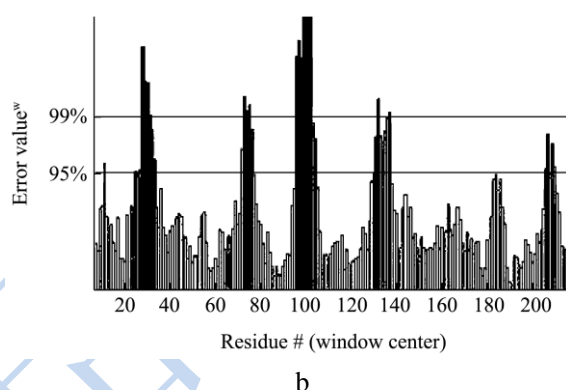
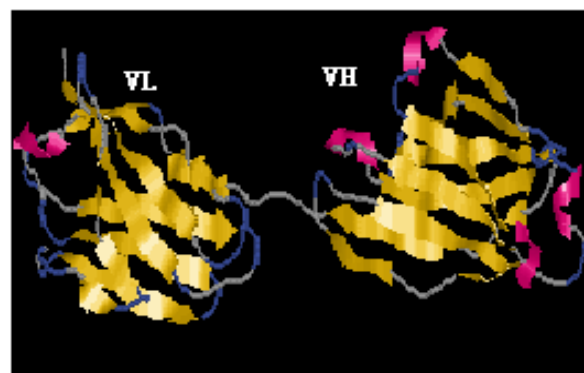


图 9 恩诺沙星可变区三维结构及 Errat 评价图

Fig.9 Variable region 3D model of ENR antibody and Errat evaluation map

### 2.9 分子对接

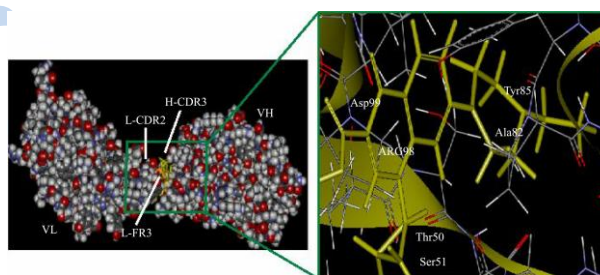


图 10 恩诺沙星可变区结构与恩诺沙星分子对接结果

Fig.10 Docking results of ENR molecule and its antibody variable region structure

在同源建模所得恩诺沙星抗体可变区三维结构的基础上, 利用计算机生物学技术将构建模型结构与恩诺沙星小分子进行对接计算, 对接结果见图 10, 从图上可以看出来自 VH 的 H-CDR3 和 VL 的 L-CDR2 和 L-FR3 共同形成一个疏水型的深凹槽 (活性口袋), 配体恩诺沙星分子在疏水性环境中被牢牢地吸卡在活性口袋里, 从外表看就像个不规则的三明治, 恩诺沙星被夹在中间。恩诺沙星分子的喹啉基团和 H-CDR3 中的 Arg98 和 Asp99 以及 Gly101 氨基酸残基相互结合, Arg98 是一个长链残基, 它的 C-C 与 C-N 键可以随意

翻转而改变构象, 从而影响恩诺沙星抗体的亲和力。恩诺沙星分子的环丙基和来自 L-CDR2 中 Thr50、Ser51 氨基酸残基相互作用; 哌嗪基与来自 L-FR3 中的 Ala82、Tyr85 氨基酸残基相互作用; 哌嗪基上的乙基基团像琵琶的头部一样扭曲地裸露在外部。此外, 对接显示除上除氨基酸残基外氢键和分子间疏水相互作用也是影响其识别及结合稳定性得重要因素。

### 3 结论

3.1 成功合成恩诺沙星免疫原并注射免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合、克隆化获得了高特异性恩诺沙星单克隆抗体。制备的单克隆抗体检测羊奶样品在恩诺沙星添加范围内回收率为 96.56~105.10%, 且与 HPLC 法检测呈良好的线性关系, 说明制备的单克隆抗体可以在实际中用于检测恩诺沙星。

3.2 成功构建了恩诺沙星单链抗体质粒并诱导表达成功, 其  $IC_{50}=0.90\pm 0.07$  ng/mL, 最低检测限为  $IC_{15}=0.09\pm 0.03$  ng/mL。

3.3 以蛋白结晶结构 (ID: 1QOK) 为模板, 采用同源建模方法首次构建了恩诺沙星抗体可变区的三维结构并进行分子对接, 通用计算机生物信息学方法找到了恩诺沙星抗体可变区的活性位点, 并定位组成活性位点的重要功能残基, 活性结合位点主要由 Arg98、Asp99、Gly101、Thr50、Ser51、Ala82、Tyr85 等氨基酸残基组成。本研究为深入认识恩诺沙星分子与其抗体分子识别机制提供了理论指导。

### 参考文献

- [1] 李继昌, 曾成武, 付春燕. 氟喹诺酮类药物在禽病防治上的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998, 10(27): 50-52  
LI Ji-chang, ZENG Cheng-wu, FU Chun-yan, et al. Fluoroquinolones Applications in poultry disease prevention and control applications [J]. Heilongjiang J Anim Sci Vet Med, 1998, 10(27): 50-52
- [2] Zhang H T, Jiang J Q, Wang Z L, et al. Development of an indirect competitive elisa for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin [J]. Biomed & Biotechnol, 2011, 12(11): 884-891
- [3] 赵银丽, 王建华, 王自良, 等. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及 ciELISA 试剂盒的研制 [J]. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(2): 33-38  
ZHAO Yin-li, WANG Jian-hua, WANG Zi-liang, et al. Preparation of monoclonal antibody and development of cielisa kit for rapid detection of enrofloxacin [J]. Journal of Northwest A&F University, 2009, 37(2): 33-38
- [4] 刘红, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星 ELISA 快速检测方法的建立 [J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(11): 13-15  
LIU Hong, Zeng Zhen-ling, YANG Gui-xiang, et al. To establish the elisa method for detecting enrofloxacin in residues [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2006, 40(11): 13-15
- [5] LIN S, HAN S Q, LIU Y B, et al. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2005, 382(5): 1250-1255
- [6] Els V C, Jan D B, Wim R. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies [J]. J. Agric. Food Chem., 2004, 52: 4975-4978
- [7] Watanabe H, Satake A, Kido Y, et al. Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assays and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices [J]. Analyst, 2002, 127: 98-103
- [8] Zeng H J, Yu B Y, Liu J H, et al. Determination of glycyrrhizin in chinese prescription and biological samples by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Anal. Chim. Acta., 2006, 64(4): 17315-17317
- [9] 何扩, 张秀媛, 杜欣军, 等. 西维因单链抗体同源建模及与西维因对接模拟研究 [J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 59-63  
HE Kuo, ZHANG Xiu-yuan, DU Xin-jun, et al. Homology modeling of anti-carbaryl scfv and molecular simulation study between scfv and its antigen carbaryl [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 59-63
- [10] Dong J X, Li Z F, Lei H T, et al. Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 736, 85-91
- [11] 涂追, 许杨, 付金衡, 等. 抗 DON 单域重链抗体序列分析及三维建模与对接 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(4): 893-898  
TU Zhui, XU Yang, FU Jin-heng, et al. Sequence analysis, 3-d modeling and molecular docking of anti-deoxyeni-valenol single-domain heavy chain antibody [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2011, 27(4): 893-898
- [12] 刘维华, 晁向阳, 祝炜东, 等. HPLC 法测定鸡肉中恩诺沙星、环丙沙星残留的研究及应用 [J]. 饲料广角, 2006, 32(14): 33-36  
LIU Wei-hua, CHAO Xiang-dong, ZHU Wei-dong, et al. Study on enrofloxacin, ciprofloxacin using HPLC method [J]. Feed China, 2006, 32(14): 33-36