

文章编号:1000-8551(2013)01-0088-05

## 庆大霉素单克隆抗体的研制及 ELISA 分析方法的建立

金仁耀<sup>1</sup> 吴建祥<sup>2</sup>

(1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院,浙江 杭州 310012; 2. 浙江大学 生物技术研究所,浙江 杭州 310058)

**摘要:**用与牛血清蛋白(BSA)交联的庆大霉素人工抗原(GM-BSA)免疫的 BALB/C 鼠脾细胞与 SP2/0 鼠骨髓瘤细胞融合,经筛选、克隆,得到 1 株能稳定分泌抗庆大霉素单抗的杂交瘤细胞株(6H8),经鉴定 6H8 的抗体类型及亚类均为 IgG1,其轻链为  $\kappa$  链。制备单克隆抗体腹水,腹水的间接 ELISA 效价在  $1 \times 10^{-7}$  以上。该单克隆抗体与庆大霉素结构类似物均无交叉反应,具有高度特异性。以制备的单抗建立间接竞争 ELISA 方法,其线性回归方程为  $y = 16.122 \ln(x) - 2.0143$  ( $R^2 = 0.9934$ ),抑制中浓度  $IC_{50}$  为  $25.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,最低检测限  $IC_{20}$  为  $3.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。竞争 ELISA 方法检测鲜奶中的庆大霉素平均回收率在 92% ~ 110% 之间。抗庆大霉素单抗的制备和竞争 ELISA 方法的建立为庆大霉素快速检测奠定了基础。

**关键词:**庆大霉素;单克隆抗体;竞争 ELISA

PREPARATION OF MONOCLONAL ANTIBODY AND DEVELOPMENT OF AN INDIRECT  
COMPETITIVE ELISA METHOD FOR GENTAMICIN

JIN Ren-yao<sup>1</sup> WU Jian-xiang<sup>2</sup>

(1. School of Food Science Biotechnology, Zhejiang Gongshang university, Hangzhou, Zhejiang 310012;

2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058)

**Abstract:** One hybridoma cell line (6H8) secreting monoclonal antibody (McAb) against gentamicin was produced by fusing mouse myeloma cells (SP2/0) with spleen cells from BALB/C which immunized by the artificial gentamicin antigen conjugated with bovine serum albumin (BSA). Isotype and subclass of the monoclonal antibody secreted from the hybridoma cell line (6H8) was classified as IgG1. The light chain of the McAb was identified to be  $\kappa$  chain. The McAb obtained could specifically react with gentamicin and its titre of ascitic fluid detected by indirect ELISA was up to  $1 \times 10^{-7}$ . The result of specificity analysis indicated that the McAb had no cross-reactivity with analogues of gentamicin. Based on the producted McAb, an indirect competitive ELISA was established, and its linear regression equation was  $y = 16.122 \ln(x) - 2.0143$  ( $R^2 = 0.9934$ ). Inhibition rate analysis showed that  $IC_{50}$  and  $IC_{20}$  values were  $25.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $3.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  gentamicin in PBS buffer, respectively. The mean recovery of gentamicin spiked in milk was from 91% to 110%. The producted anti-gentamicin McAb and established competitive ELISA method could lay the foundation for rapid detection of gentamicin residue.

**Key words:** Gentamicin; monoclonal antibody; competitive ELISA

庆大霉素(Gentamicin, GM)是由小单胞菌产生的一种氨基糖苷类抗生素,对多种革兰氏阴性和阳性菌

都具有显著的抗菌效果,对奶牛乳房炎、子宫内膜炎等有很好的疗效,并作为饲料添加剂和治疗疾病的抗生

收稿日期:2012-03-26 接受日期:2012-08-13

基金项目:浙江省科技计划项目(2011C22078)

作者简介:金仁耀(1981-),男,浙江遂昌,博士,助理研究员,主要从事免疫化学分析和食品安全检测领域的研究。Tel: 0571-88071024-7587; E-mail: nodjin@163.com

素广泛应用于畜牧业。然而,庆大霉素不规范用药会引起畜产品,尤其是泌乳动物的乳汁中药物残留,这种药物残留对人体器官具有明显的毒害作用,如对脑神经、听觉以及肾脏的损害等。为此,国内外相继规定了其在动物性食品中的最高残留限量。我国农业部 2002 年发布的《动物性食品中兽药最高残留量》中规定,在牛奶、牛肉、猪肉等食品中庆大霉素的最大残留量(MRL)为  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[1]</sup>,日本规定在牛奶、鸡肉和猪肉等动物性食品中的最大残留限量为  $100\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,美国规定猪脂肪食品中最高残留限量为  $400\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,欧盟规定在动物性食品中最大残留限量为  $50\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

目前国内外关于庆大霉素等残留的检测方法主要是仪器分析和免疫分析<sup>[2-6]</sup>。由于免疫分析具有高特异性和灵敏度、高通量、检测成本低、操作简单、可现场操作等众多优点,已被广泛应用于小分子药物残留检测<sup>[7-12]</sup>。本研究用杂交瘤技术制备抗 GM 单克隆抗体,并建立快速检测竞争 ELISA 分析方法,为进一步研制开发 GM 快速检测试剂盒奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂 庆大霉素、链霉素、卡那霉素、新霉素、氯霉素、青霉素、氨苄青霉素、四环素、牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、Freund 氏完全和不完全佐剂、聚乙二醇(PEG)、碳化二亚胺(EDC)、TMB 底物、降植烷、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二体、抗体类型及亚类鉴定试剂盒均购自 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基、HAT、HT 购自 GIBCO;96 孔细胞板和 96 孔酶标板均为 Corning 产品;其他化学试剂均为分析纯。

1.1.2 细胞及实验动物 鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 购自中国科学研究院上海细胞研究所。7~8 周龄雌性 BALB/C 鼠购自中国科学院上海实验动物中心。

### 1.2 试验方法

1.2.1 人工抗原的合成与鉴定 免疫原 GM-BSA、包被抗原 GM-OVA 的合成参照刘宣兵等的方法<sup>[13]</sup>。取 20mg GM 和 12mg BSA 或 OVA 分别用 1mL 超纯水溶解后,BSA 或 OVA 溶液在搅拌下将 GM 溶液逐滴加入;称取 62mg EDC 溶解于 1mL 超纯水中后逐滴加入到上述混合液中,室温下搅拌反应 4h,将反应产物装入透析袋在 PBS 中透析 2d,每 4h 换液 1 次,透析后分装,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。通过紫外扫描和 SDS-PAGE 法检测是否偶联成功。紫外扫描:把合成的偶联物 GM-BSA

溶液、GM-OVA 溶液和 BSA 溶液、OVA 溶液、GM 溶液,分别在 200nm~400nm 波长范围内(间隔 1nm)进行扫描,通过扫描曲线对比证明偶联成功与否。SDS-PAGE 法:配制电泳浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%,浓缩胶电压为 75V,分离胶电压为 90V,考马斯亮蓝染色 6h 后置脱色液中过夜脱色。

1.2.2 免疫方案 取 7~8 周龄、体重 18~20g BALB/C 雌性小鼠 5 只,将制备的免疫原 GM-BSA 与等体积弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,经背腹部皮下多点注射,剂量为  $50\mu\text{g}/\text{只}$ ,以后每隔 3 周,取抗原(与一免等剂量)和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后皮下和腹腔注射加强免疫,加强免疫共 4 次,融合前 3d 加倍剂量强化免疫一次。

1.2.3 细胞的融合及培养 参照吴建祥等<sup>[14]</sup>的方法进行,按免疫鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞 5~10:1 的比例混合细胞,在 50% PEG 下融合、洗涤、沉淀后,用 HAT 培养基悬浮,接种于 96 孔含有饲养细胞的细胞板中, $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养。培养 3~5d 后,用 HAT 培养基再换液 1 次,第 10 天换为 HT 培养基培养。

1.2.4 杂交瘤细胞的筛选与克隆 待融合细胞生长到覆盖培养孔 10%~30% 孔底面积时,取上清用间接 ELISA 筛选抗体阳性孔,筛选时包被抗原为 GM-OVA 交联物,并以 OVA、BSA 作阴性对照。筛选出的阳性反应孔进一步用竞争 ELISA 分析抗体的检测灵敏度。灵敏度好的杂交瘤细胞用有限稀释法连续克隆 3~4 次,最后一次克隆后检测为阳性的孔所得细胞株即为分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。杂交瘤细胞经扩大培养后,用于腹水制备,对建立的细胞株移入细胞冻存管并放入液氮中长期保存。

1.2.5 腹水的制备与纯化 参照青玲等<sup>[15]</sup>的方法进行腹水制备,BALB/C 小鼠腹腔注射降植烷, $0.3\text{mL}/\text{只}$ ,7~10d 后同法注射单克隆细胞  $1\times 10^6\sim 2\times 10^6$  个( $0.4\text{mL}/\text{只}$ ),待小鼠腹腔明显胀大后抽取腹水,离心除去油脂沉淀后,即得小鼠腹水 MAb。腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化<sup>[16]</sup>,用紫外分光光度计分别测定纯化抗体的紫外 260nm 和 280nm 的光密度,用 Lowry-kalokar 公式计算蛋白质浓度,其余纯化的单抗  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.6 抗体类型及亚类鉴定和腹水效价测定 采用 Sigma 公司的羊抗鼠 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM 标准抗血清,将纯化的腹水抗体作适当稀释后用琼脂双扩散法测定,24h 后观察沉淀线,判断单抗的抗体类型及亚类。以 GM-OVA 交联物为包被抗原的间接

ELISA 法测定腹水效价。

1.2.7 间接竞争 ELISA 方法的建立和单克隆抗体的特异性和灵敏度测定 参照 Wu 等<sup>[17]</sup>的方法,先用间接 ELISA 方阵滴定方法确定抗原抗体最佳工作浓度,然后用间接竞争 ELISA 法对链霉素、青霉素、氨苄青霉素、庆大霉素、卡那霉素、四环素、新霉素等做抑制反应曲线,求出抑制反应 50% 所需的抗生素浓度 ( $IC_{50}$ ),交叉反应率<sup>[18]</sup>为庆大霉素  $IC_{50}$  与结构类似物  $IC_{50}$  的比值。即交叉反应率 (%) = ( $IC_{50}$  GM/ $IC_{50}$  类似物) × 100%。

1.2.8 添加回收率试验 取鲜牛奶  $12000r \cdot \min^{-1}$  离心 10min,去除上层脂肪层及沉淀,取中间清液配置 GM 标准溶液 (0、1、2、4、8、16、32、64 和  $128 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),建立标准曲线。具体操作步骤如下:样品设 10、20、40 和  $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  4 个添加浓度待测样品,并标记对照孔 (只加  $0.01 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS,不加一抗),每个样品检测 4 次;在包被好抗原的 ELISA 板中,每孔加入最佳工作浓度的 GM 单克隆抗体和待测样品各  $50 \mu\text{L}$ ,微量振荡器上震荡 45s, $37^\circ\text{C}$  孵育 1h,PBST 洗涤 3 次;每个样品孔中加入  $1:8000$  倍稀释的羊抗鼠 HRP 标记的酶标二抗, $37^\circ\text{C}$  孵育 1h,PBST 洗板 6 次;每孔加入  $100 \mu\text{L}$  TMB 底物显色液, $37^\circ\text{C}$  显色反应 15min,加入  $2 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  硫酸终止液  $50 \mu\text{L}$  终止反应;用酶标仪读取各孔  $OD_{450}$  值。结果判定:根据各样品的抑制率,代入回归方程,计算样品质量浓度的对数值  $x$ ,求其反对数,即为样品中所含 GM 的质量浓度,然后样品中的理论计算值与实际添加值的比值即为添加回收率。

## 2 结果与分析

### 2.1 人工抗原合成的鉴定

根据图 1 的紫外扫描结果,GM 与 BSA、OVA 的偶联物与载体蛋白的最大吸收峰 (BSA:  $278 \text{nm}$ ; OVA:  $279 \text{nm}$ ) 相比,发生明显变化,表明半抗原与载体蛋白成功发生了偶联。SDS-PAGE 电泳 (图 2) 显示:BSA 和 OVA 的移动速度大于 BSA-GM 和 OVA-GM,且 BSA-GM 和 OVA-GM 电泳条带有拖尾现象,说明 BSA-GM 和 OVA-GM 的分子量大于 BSA 和 OVA,进一步表明免疫抗原 BSA-GM 和包被抗原 OVA-GM 偶联成功。

### 2.2 杂交瘤细胞融合、筛选、克隆

小鼠脾细胞和 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合后 12d 用间接 ELISA 法筛选细胞培养上清中庆大霉素抗体,并选择其中 120 个呈强阳性反应的细胞孔用间接竞争 ELISA 分析抗体灵敏度。最后筛选 2 个较理想的阳性

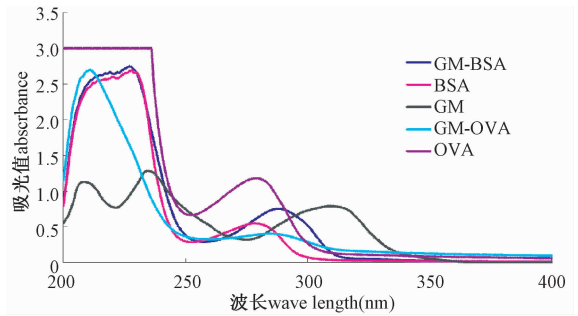


图 1 GM 人工抗原紫外扫描图

Fig. 1 UV spectrum of GM artificial antigen and haptens

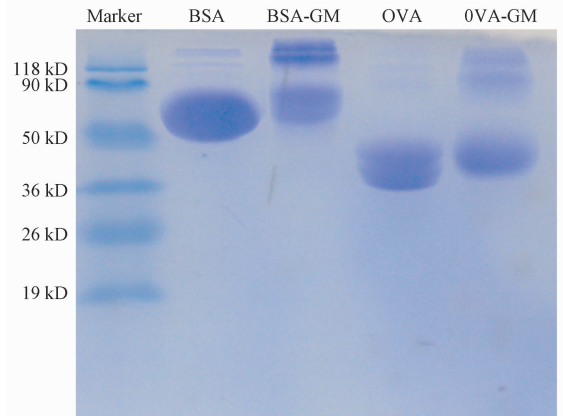


图 2 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE of GM artificial antigen

孔进行有限稀释法克隆,最终获得 1 株能分泌抗庆大霉素的杂交瘤细胞 6H8,该细胞株分泌的单抗仅与庆大霉素有特异性反应,而与 OVA、BSA 均无任何反应,说明该抗体是特异性针对庆大霉素;经 6 个月以上体外传代和多次冻存复苏后,该细胞株均能良好生长,并稳定分泌抗体。

### 2.3 腹水制备、抗体类型及亚类鉴定、效价测定

注射降植烷的 BALB/C 小鼠腹腔注射单克隆杂交瘤细胞 6H8,待腹部明显膨胀后采集腹水,每只小鼠可取 2~10mL 腹水。用辛酸-硫酸铵方法纯化单克隆抗体腹水,经测定蛋白质浓度为  $6.52 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,抗体类型及亚类鉴定结果表明,6H8 抗体类型及亚类为 IgG1、 $\kappa$  轻链。单克隆抗体腹水的间接 ELISA 效价在  $1 \times 10^{-7}$  以上。

### 2.4 间接竞争 ELISA 法的建立和单克隆抗体 50% 抑制浓度及灵敏度测定

经方阵试验测定,该抗体的最佳包被抗原浓度为  $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,抗体浓度为  $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (以  $OD_{450}$  为 1.0 左右),用间接竞争 ELISA 法测定庆大霉素的竞争抑制曲线,然后绘制免疫反应抑制率和浓度半对数曲

线图(图 3),线性回归方程为  $y = 16.122\ln(x) - 2.0143$  ( $R^2 = 0.9934$ ),求出抑制反应 80% ( $IC_{80}$ )、50% ( $IC_{50}$ )和 20% ( $IC_{20}$ )所需的庆大霉素浓度分别为  $161.9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $25.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和  $3.9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以  $IC_{20}$ 值为该抗体的检测灵敏度。

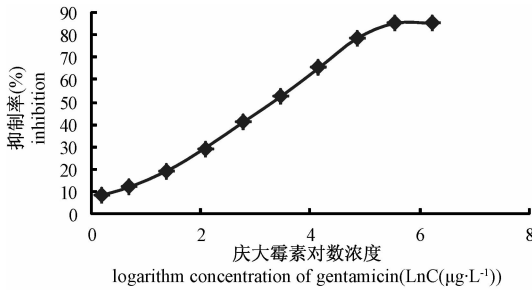


图 3 间接竞争 ELISA 的抑制率反应曲线

Fig. 3 Inhibition reaction curve of indirect competitive ELISA

## 2.5 单克隆抗体特异性鉴定

用间接竞争 ELISA 方法检测该单抗对链霉素、新霉素、卡那霉素、氯霉素、青霉素等抗生素的 50% 抑制浓度,结果如表 1 所示。该单抗与链霉素、新霉素、卡那霉素、氯霉素、青霉素、氨苄青霉素、四环素的交叉反应率均小于 0.03%,表明所制备的单克隆抗体对庆大霉素具有高特异性。

表 1 单克隆抗体特异性

Table 1 Specificity of the monoclonal antibody

化合物 compounds	抑制中浓度 $IC_{50}(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	交叉反应率 cross reactivity (%)
庆大霉素 Gentamicin	25.2	100%
链霉素 Streptomycin	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
青霉素 Penicillin	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
氨苄青霉素 Ampicillin	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
卡那霉素 Kanamycin	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
氯霉素 Chloroamphenicol	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
四环素 Tetracycline	$>1 \times 10^5$	$<0.03$
新霉素 Neomycin	$>1 \times 10^5$	$<0.03$

## 2.6 添加回收率试验

向鲜奶中添加  $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的庆大霉素,

进行添加回收率试验。结果如表 2 所示,庆大霉素的平均添加回收率在 92% ~ 110% 之间,变化范围在 87% ~ 125% 之间,其中低浓度的添加回收率偏高,可能由于样本有一定的自然本底,对检测结果造成影响,从所有添加浓度试验看,检测结果的变异系数在 4.4% ~ 10.6% 之间,说明所制备的单克隆抗体和所建立的竞争 ELISA 方法具有较好的准确度和稳定性,为进一步开发庆大霉素快速检测试剂盒奠定了基础。

表 2 鲜奶添加庆大霉素的回收率

Table 2 Recovery of gentamicin spiked from milk

添加浓度 concentration ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	平均回收率 mean recovery (%)	变化范围 range of variation	变异系数 CV (%)
10	109.9	97 ~ 125	10.6
20	98.7	91 ~ 106	5.8
40	102.4	96 ~ 110	4.7
80	92.0	87 ~ 98	4.4
平均	100.8	—	6.4

## 3 讨论

近几年,免疫检测技术在抗生素、农药、激素等小分子化合物残留分析中的应用越来越广泛,而抗体的制备是建立免疫检测技术的关键,其中抗原质量的好坏极大影响着抗体质量,因此提供高质量的抗原是制备优异抗体的前提条件。庆大霉素是小分子药物抗原,不具有免疫原性,因此首先需合成具有免疫原性的人工抗原,常用的方法是与载体蛋白如 BSA、OVA 等偶联,利用载体蛋白的免疫原性诱导动物产生针对药物的抗体。庆大霉素含有可结合的氨基,可用 EDC 法将庆大霉素的氨基与载体蛋白的羧基连结起来,通过与 EDC 反应后,庆大霉素与载体蛋白之间形成具有一定空间距离的碳链结合臂,保证庆大霉素分子处于载体蛋白结构外侧,突出抗体识别位点,有利于抗庆大霉素抗体的制备和筛选。

体内诱生法制备腹水仍是目前最经济、高效和广泛应用的大量制备单克隆抗体的办法。在动物的选择上,建议选用 12 周以上的健康活泼小鼠为对象,周龄过小腹水产量较低,在接种杂交瘤细胞的前 7 ~ 10d 左右,给小鼠注射液降植烷,其原理是降植烷可有效抑制小鼠淋巴细胞的免疫功能,降低小鼠机体免疫能力,有利于杂交瘤在小鼠腹腔的生长;本试验采用降植烷预处理小鼠,7d 后注射杂交瘤,待腹部隆起后收集腹水,同时对于腹水产量较多的小鼠,应采取多次抽取法,可有效提高小鼠腹水产量。

目前已有庆大霉素人工抗原的合成、Dot-ELISA快速免疫分析技术方面的研究报道,但前者采用的是制备多克隆抗体的办法,后者虽然也采用单克隆抗体为研究材料,但进行的是 Dot-ELISA 分析方法,与本文的研究手段不同,本研究采用 EDC 法偶联 BSA-GM 和 OVA-GM,并通过采用紫外扫描和 SDS-PAGE 电泳进行鉴定,确证人工抗原合成成功。通过动物免疫、细胞融合、筛选、克隆和腹水制备,获得 1 株抗庆大霉素的特异性单克隆抗体,经多次传代、冻存与复苏,杂交瘤分泌抗体稳定;通过建立的 ELISA 分析方法,其抑制中浓度  $IC_{50}$  为  $25.2\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,检测灵敏度  $IC_{20}$  为  $3.9\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,具有较高的灵敏度,对鲜奶进行添加回收率试验,为降低鲜奶样本自身本底的干扰,本研究采用鲜奶处理后的样品为基准溶液,实现标准曲线缓冲体系与检测样本体系的一致,降低自然本底的干扰。试验表明:添加浓度在  $10\sim 80\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,回收率介于  $92\%\sim 110\%$  之间,结果较理想且结果稳定性较好,能较好的满足目前牛奶中庆大霉素最大残留限量  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的要求,为进一步开发庆大霉素快速检测试剂盒奠定了技术基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 农业部畜牧兽医局. 动物源食品中兽药最大残留限量[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(4): 15-20
- [ 2 ] Posyniak A, Zmudzki J, Niedzielska J. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 914(1-2): 59-66
- [ 3 ] Lecaroz C, Campanero M A, Gamazo C, et al. Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 58(3): 557-563
- [ 4 ] 刘承伟, 罗志辉, 陆慰天, 于兰, 卢昕, 赵书林. HPLC-共振瑞利散射联用测定庆大霉素各组分[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2010, 28(3): 37-40
- [ 5 ] 齐雪琴. 电化学液相色谱分析庆大霉素的方法[J]. 福建分析测试, 2009, 16(20): 21-22
- [ 6 ] 陈艳, 梁赤周, 吴斌, 邹明强, 薛强, 郭良宏. 庆大霉素快速 Dot-ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 237-240
- [ 7 ] 王选年, 杨艳艳, 邢广旭, 李青梅, 样继飞. 盐酸克伦特罗单抗快速检测试剂盒的研制[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(1): 75-78
- [ 8 ] 范国英, 王建华, 王自良, 张改平, 邓润广, 杨继飞. 链霉素残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒的研制及其性能测定[J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(1): 82-84
- [ 9 ] 金仁耀, 桂文君, 吴建祥, 王春梅, 朱国念. 毒死蜱单克隆抗体的研制[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(6): 591-597
- [ 10 ] JIN R Y, GUI W J, GUO Y R, et al. Comparison of Monoclonal Antibody-based ELISA for Triazophos between the Indirect and Direct Formats[J]. Food and Agricultural Immunology, 2008, 19(1): 49-60
- [ 11 ] Liang C Z, Jin R Y, Gui W J, et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Monoclonal Antibody for the Detection of the Insecticide Triazophos: Assay Optimization and Application to Environmental Samples[J]. Environmental science & technology, 2007, 41: 6783-6788
- [ 12 ] Zhang G P, Wang X N, Yang J F, et al. Development of an immuno chromatographic lateral flow test strip for detection of beta-adrenergic agonist Clenbuterol residues[J]. Journal of Immunology Methods, 2006, 312(1-2): 27-33
- [ 13 ] 刘宣兵, 张改平, 侯玉泽, 邓瑞广, 赵东, 李彬彬, 柴书军. 庆大霉素人工抗原的合成与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, (12): 64-65
- [ 14 ] 吴建祥, 林福呈, 李德葆, 陈正贤, 娄沂春. 稻瘟病菌单克隆抗体的研制及其对稻瘟病菌附着胞形成的影响[J]. 微生物学报, 2000, 40(6): 638-645
- [ 15 ] 青玲, 吴建祥, 戚益军, 周雪平, 李德葆. 蚕豆萎蔫病毒单克隆抗体的研制及检测应用[J]. 微生物学报, 2000, 40(2): 166-173
- [ 16 ] 陈伯权, 吴美英, 叶群瑞. 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较[J]. 病毒学报, 1990, 6(2): 122-126
- [ 17 ] Wu Jian-xiang, Zhang Shao-en, Zhou Xue-ping. Monoclonal antibody-based ELISA and colloidal gold-based immunochromatographic assay for streptomycin residue detection in milk and swine urine[J]. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology), 2010, 11(1): 52-60
- [ 18 ] Abad A, Moreno M J, Montoya A. Development of monoclonal antibodybased immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide Carbofuran[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(6): 2475-2485