

苯乙醇胺 A 人工抗原的制备与鉴定

蔡齐超^{1,2}, 胡晓飞¹, 侯玉泽², 王 耀², 殷萌琪¹, 王方雨¹, 邓瑞广^{1*}, 张改平³

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003; 3. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为合成苯乙醇胺 A 人工抗原, 并制备出鼠源苯乙醇胺 A 多抗血清, 采用琥珀酸酐法改造苯乙醇胺 A, 应用活化脂法(DCC)和碳二亚胺法(EDC)与载体蛋白相连, 合成人工免疫原苯乙醇胺 A-BSA和检测原苯乙醇胺 A-OVA, 并用紫外扫描光谱法、凝胶电泳法(SDS-PAGE)和酶联免疫吸附法(ELISA)鉴定偶联结果。结果显示, 在紫外扫描光谱下, 合成的免疫原在 276 nm 处出现最大吸收峰; SDS-PAGE 电泳发现, 免疫原出现明显的拖尾现象; 按 10 μg /只的剂量免疫小鼠, 共免疫 4 次, 每次间隔 3 周, 最后 1 次免疫 10 d 后, 断尾采血, 经测定, 得到的多抗血清的效价均达到 1:10 000, 且 1 号小鼠多抗血清的敏感性最好, 半数抑制浓度(IC_{50})为 536.8 ng/mL, 与其他药物的交叉反应率均小于 0.5%, 具有很好的特异性。成功合成了苯乙醇胺 A 人工抗原, 并得到了敏感性高、特异性好的多抗血清。

关键词: 苯乙醇胺 A; 人工抗原; 多抗血清; 酶联免疫吸附法

中图分类号: S859.84 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)07-0150-06

Preparation and Identification of Phenylethanolamine A Artificial Antigen System

CAI Qi-chao^{1,2}, HU Xiao-fei¹, HOU Yu-ze², WANG Yao², YIN Meng-qi¹,
WANG Fang-yu¹, DENG Rui-guang^{1*}, ZHANG Gai-ping³

(1. Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

3. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to synthesize the artificial antigen for Phenylethanolamine A and prepare murine polyclonal antiserum against Phenylethanolamine A, Phenylethanolamine A was modified by succinic anhydride method and connected to carrier protein via active ester method (DCC) and Carbodiimide method (EDC). Two complete antigens of Phenylethanolamine A (Phenylethanolamine A-BSA and Phenylethanolamine A-OVA) were prepared successfully and identified via UV spectrophotometry, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and ELISA. The maximum absorption peak of Phenylethanolamine A-BSA occurred in 276 nm under the UV scanning spectrum, and SDS-PAGE results showed that the Phenylethanolamine A-BSA appeared obvious trailing phenomenon. Based on the results, BALB/c mice were immunized with 10 μg Phenylethanolamine A-BSA per mouse for four times at the intervals of three weeks. Ten days after the last immunization, polyclonal antisera

收稿日期: 2014-01-09

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201203040); 河南省扶持企业自主创新资金项目(2013YQ29)

作者简介: 蔡齐超(1989-), 男, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测。E-mail: 01270037abc@163.com

* 通讯作者: 邓瑞广(1960-), 男, 河南平顶山人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事动物疫病和食品安全快速检测技术研究。
E-mail: rgd999@163.com

were collected by cutting tail procedure. All the titers of three polyclonal antisera were 1 : 10 000 approximately. The antiserum from No. 1 mouse had the highest sensitivity with IC_{50} of 536.8 ng/mL. Its rates of cross reaction with other drugs were all lower than 0.5%, which demonstrated the polyclonal antisera had high specificity. In conclusion, the artificial antigen for Phenylethanolamine A was synthesized and polyclonal antiserum with high sensibility and specificity was obtained successfully.

Key words: Phenylethanolamine A; artificial antigen; polyclonal antiserum; ELISA

苯乙醇胺 A (Phenylethanolamine A) 又称克伦巴胺, 是一种类白色结晶粉末, 分子式为 $C_{19}H_{24}N_2O_4$, 微溶于水, 易溶于乙醇、乙醚、氯仿^[1-2]。苯乙醇胺 A 与“瘦肉精”相似, 均为 β -肾上腺素受体激动剂, 添加入饲料后, 可刺激动物生长, 加强蛋白质在动物体内沉积, 提高基础代谢水平, 进而提高瘦肉率^[3]。

苯乙醇胺 A 有很强的毒性, 对人和动物都有很大的危害。对于小鼠来说, 腹腔注射的半数致死量 (LD_{50}) 为 600 mg/kg, 静脉注射的 LD_{50} 为 75 mg/kg^[3]。人食用了少量含有苯乙醇胺 A 的猪肉后, 会出现恶心、头晕、四肢无力、手颤等中毒症状, 食用含有大量苯乙醇胺 A 的猪肉则有可能导致染色体畸变, 诱发恶性肿瘤^[4]。因此, 早在 2011 年, 苯乙醇胺 A 就已经被农业部第 1519 号公告列为禁止在饲料和动物饮水中使用的物质^[5-6]。

为避免食品中苯乙醇胺 A 的污染对人体健康造成危害, 建立针对食品中苯乙醇胺 A 的定性定量检测方法尤为重要。目前, 苯乙醇胺 A 的检测方法主要是高效液相色谱-串联质谱法, 但因其所需仪器昂贵、操作技术要求高等因素, 在实际生产中难以得到广泛推广^[7-12]。而酶联免疫吸附法 (ELISA) 以其样品前处理简单、特异性强、灵敏度高、分析时间短等特点, 在小分子抗原检测中具有非常广阔的前景^[2-3, 13]。苯乙醇胺 A 是小分子物质, 属于半抗原, 没有免疫原性, 需与蛋白质等大分子物质偶联, 形成完全抗原。因此, 建立其 ELISA 检测方法的关键就是成功制备出苯乙醇胺 A 人工抗原。目前, 尚未见关于苯乙醇胺 A 免疫学检测的报道, 鉴于此, 本研究合成了苯乙醇胺 A 人工抗原并对其鉴定, 以期苯乙醇胺 A 免疫学快速检测方法的建立奠定基础。

1 材料和方法

1.1 溶液与试剂

稀释液 PBS (0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液)、洗涤液 PBST (PBS : Tween20 = 2 000 : 1)、包被液 CBS (0.05 mol/L $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 缓冲液)、封闭液 (PBST : 猪血清 = 20 : 1)、TMD 底物缓冲液、终止

液 (2 mol/L H_2SO_4) 均由本实验室配制。

苯乙醇胺 A (纯度 $\geq 98.0\%$) 购自 Sigma 公司, 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC) 购自 Thermo scientific 公司, 1,3-二环己基碳二亚胺 (DCC) 购自吉尔生化 (上海) 有限公司, 羊抗鼠酶标二抗 (GaMIgG-HRP) 购自华美生物工程有限公司, 其他常规试剂均为 AR 级。

1.2 仪器

U-3000 紫外扫描仪 (UV) 为日本岛津公司产品, IMARK 型酶标仪为北京友华照钦医疗器械有限公司产品, AE260 电子天平为德国 METTLER 公司产品, DHG-9123A 型鼓风干燥箱为上海一恒科学仪器有限公司产品, MH-2 微量振荡器为海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品, JM-250 电泳仪为大连捷迈科贸有限公司产品, DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、RE-5299 旋转蒸发仪均为巩义市予华仪器有限责任公司产品。

1.3 供试动物

7 周龄左右的雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠购自郑州大学医学院实验动物中心, 由本实验室饲养。

1.4 方法

1.4.1 人工抗原的合成

1.4.1.1 合成苯乙醇胺 A 改造物 参考文献^[14]的方法, 采用琥珀酸酐法改造苯乙醇胺 A (图 1)。称取 2 mg 苯乙醇胺 A 和 1 mg 琥珀酸酐置于圆底烧瓶中, 加入 4 mL 吡啶作为溶剂, 120 °C 加热回流 (油浴) 反应 4 h。旋转蒸发仪将溶剂旋干, 即可得到苯乙醇胺 A 改造物, 用 400 μ L DMF 溶解。

1.4.1.2 免疫原的制备 参考文献^[15]的方法, 采用 DCC 法合成人工抗原 (图 2)。取 200 μ L DMF 溶解的苯乙醇胺 A, 加入 1 mg DCC, 再加入 200 μ L DMF 溶解的 NHS (1 mg), 滴加到上述反应液中, 室温搅拌 8 h, 此为反应液 A 液。将 3.3 mg BSA 溶于 2 mL PBS 中, 为反应液 B 液。将 A 液以 1 滴/s 的速度加到 B 液中, 4 °C 搅拌过夜。次日将混合液放入洁净的透析袋中, 4 °C 条件下, 用 PBS 搅拌透析 3 d, 每天换液 4 次。透析后即得到苯乙醇胺 A-BSA。

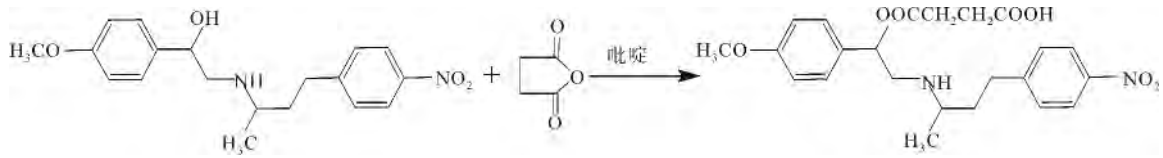


图 1 苯乙醇胺 A 改造物的合成

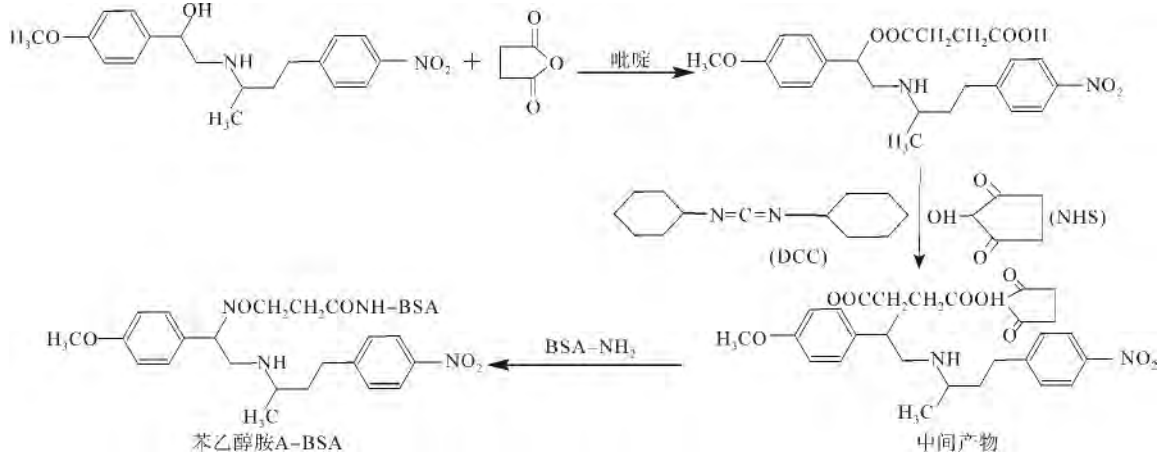


图 2 苯乙醇胺 A 免疫原的合成

1.4.1.3 包被原的制备 参照文献[16]的方法,采用 EDC 法合成包被原(图 3)。取 200 μL DMF 溶解的苯乙醇胺 A,加入 300 μL 双蒸水配成混合液,加入 1 mg EDC,在室温的条件下避光活化 4 h 后,再补加

1 mg EDC。将 2.2 mg OVA 溶于 PBS 中,将该溶液以 1 滴/s 的速度加入上述混合液中,室温搅拌 24 h。将反应液装入透析袋,方法同上(1.4.1.2 免疫原的制备)。透析后即得到苯乙醇胺 A-OVA。

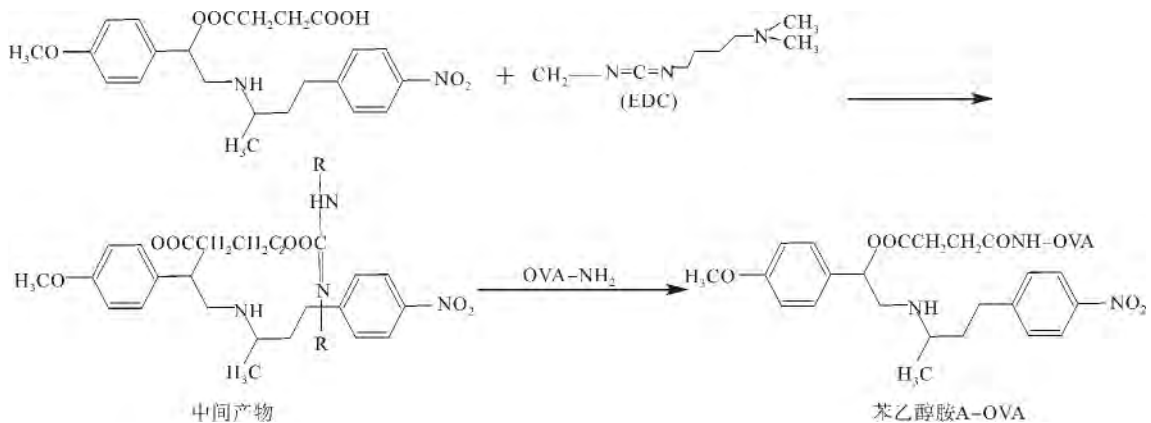


图 3 苯乙醇胺 A 包被原的合成

1.4.2 紫外扫描鉴定 用 PBS 配制浓度相同的苯乙醇胺 A、BSA、OVA 标准溶液及苯乙醇胺 A-BSA、苯乙醇胺 A-OVA,紫外扫描仪测定在波长 220~440 nm 的最大吸收峰及特征值。

1.4.3 SDS-PAGE 鉴定 由于所分离的蛋白质比较单一,且分子量较大,所选的电泳条件为:浓缩胶体积分数为 5%,电压 90 V;分离胶体积分数为 12%,电压 110 V;上样量 20 μL ,其中蛋白质含量为 2 μg 。考马斯亮蓝染色 5 h 后,置脱色液中脱色^[17],

每隔 2 h 换一次脱色液。

1.4.4 多抗血清的制备及鉴定

1.4.4.1 动物免疫 用 PBS 溶解苯乙醇胺 A-BSA 至终质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与等体积的弗氏完全佐剂(FCA)混合,充分乳化后,免疫 3 只小鼠,背部皮下 6 点注射,免疫剂量 10 $\mu\text{g}/\text{只}$,共免疫 4 次,免疫间隔 3 周。4 免后 10 d 断尾采血,用 PBS 进行 100 倍稀释(10 μL 血液+990 μL PBS),3 000 r/min 离心 5 min,取上清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[18-19]。

1.4.4.2 检测板的制备 将苯乙醇胺 A-OVA 用 CBS 缓冲液稀释至 5 μg/mL,充分混匀后,每孔加入 50 μL,37 ℃ 温育 2 h, PBST 洗板;加封闭液(5%猪血清,200 μL/孔),4 ℃ 封闭过夜,PBST 洗板;晾干后 4 ℃ 密封保存^[20-21]。

1.4.4.3 血清效价测定 采用 ELISA 方法测定多抗血清效价。取检测板,50 μL/孔 PBS 铺底,第一排加 50 μL/孔多抗血清,依次往下,加入成倍稀释后的血清,设置阴性对照(NC)和空白对照(BC),37 ℃ 孵育 15 min,PBST 洗板 5 次;加 GaMlgG-HRP(用 5%猪血清进行 1:1 000 倍稀释)50 μL/孔,37 ℃ 孵育 30 min,PBST 洗板 5 次;加 TMB 显色液 50 μL/孔,显色 5~10 min;加终止液 50 μL/孔,终止反应,iMark 酶标仪读 OD₄₅₀ 值。结果判断:待测孔 OD₄₅₀≥0.2,且待测孔 OD₄₅₀与 NC OD₄₅₀的比值≥2.1 时,即判为阳性。

1.4.4.4 血清抑制测定 采用间接竞争 ELISA 测定苯乙醇胺 A 多抗的敏感性。用 50 μL/孔 PBS 铺底,加入不同浓度的苯乙醇胺 A 标准品作抑制剂,再加入 OD₄₅₀为 1.0 左右的小鼠血清 50 μL/孔,方法与 1.4.4.3 相同。最后计算抑制率(B/B₀,B₀为苯乙醇胺 A 浓度为 0 时的 OD₄₅₀,B 为苯乙醇胺 A 其他不同浓度的 OD₄₅₀)和多抗血清对苯乙醇胺 A 的半数抑制浓度(IC₅₀),以 IC₅₀衡量其敏感度。

1.4.4.5 血清特异性测定 以黄曲霉毒素 M₁(Aflatoxin M₁)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone)、伏马菌素 B₁(Fumonisin B₁)、呕吐毒素(Vomitoxin)、新霉素(Neomycin)为竞争反应的竞争物,依据竞争 ELISA 的方法进行试验,求出各个竞争物的 IC₅₀。设定苯乙醇胺 A 抗体对苯乙醇胺 A 的 IC₅₀为 100%,分别计算各竞争物 IC₅₀的百分比,也就是苯乙醇胺 A 与其他竞争物之间的交叉反应率^[22]。

2 结果与分析

2.1 紫外扫描鉴定结果

由图 4 可以看出,BSA、苯乙醇胺 A、苯乙醇胺

A-BSA 的吸收峰分别在 280、273、276 nm,苯乙醇胺 A-BSA 的紫外吸收峰与 BSA 和苯乙醇胺 A 均不重合,且苯乙醇胺 A-BSA 的吸收峰位于二者之间,初步判定苯乙醇胺 A 偶联 BSA 成功。

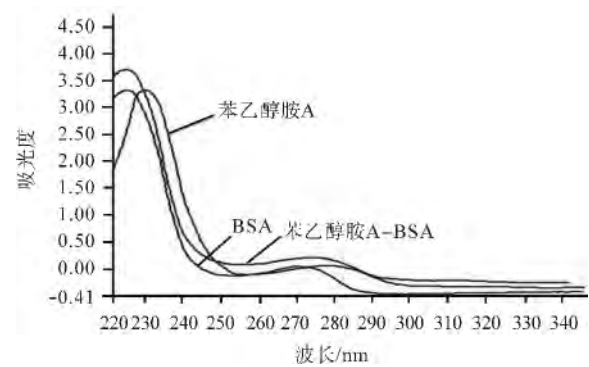


图 4 BSA、苯乙醇胺 A 和苯乙醇胺 A-BSA 的紫外扫描光谱

2.2 SDS-PAGE 鉴定结果

由图 5 可以看出,BSA 的位移比苯乙醇胺 A-BSA 大,说明 BSA 的分子量小于苯乙醇胺 A-BSA,且苯乙醇胺 A-BSA 存在有明显的拖尾现象,表明苯乙醇胺 A 偶联 BSA 成功。

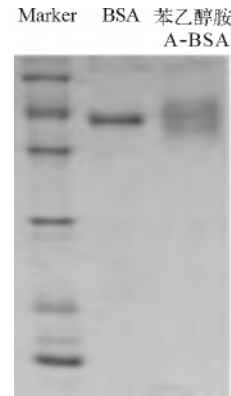


图 5 苯乙醇胺 A-BSA 偶联物的 SDS-PAGE 鉴定

2.3 多抗血清 ELISA 鉴定结果

2.3.1 间接 ELISA 测定效价结果 由表 1 和图 6 可知,3 只小鼠血清抗体效价均达到了 1:10 000,其中 1 号小鼠达到 1:12 800,说明用苯乙醇胺 A-BSA 免疫小鼠,具有良好的免疫效果。

表 1 间接 ELISA 效价测定结果

小鼠序号	抗血清稀释倍数							阴性对照	空白对照
	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800		
1	1.899	1.024	0.607	0.396	0.346	0.165	0.139	0.062	0.060
2	1.524	0.602	0.413	0.181	0.150	0.111	0.079	0.064	0.059
3	1.214	0.721	0.460	0.339	0.197	0.178	0.099	0.061	0.057

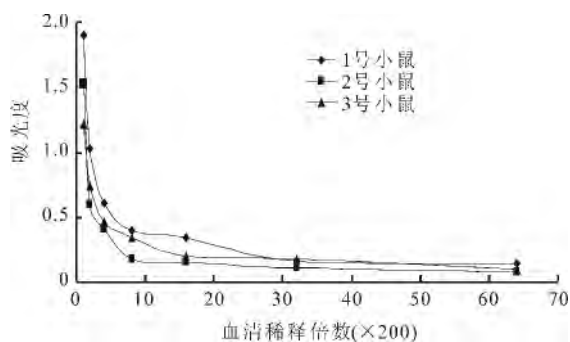
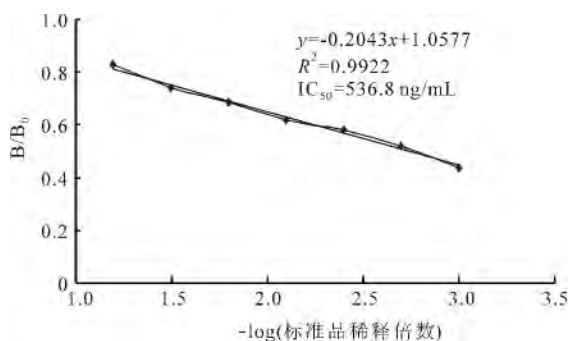


图 6 小鼠的血清效价

2.3.2 间接竞争 ELISA 测定敏感性结果 选取免疫效果最好的 1 号小鼠血清绘制标准抑制曲线。由图 7 可以看出, 1 号小鼠的多抗血清标准抑制曲线的方程为 $y = -0.2043x + 1.0577$, 决定系数 $R^2 = 0.9922$, $IC_{50} = 536.8 \text{ ng/mL}$, 表明本试验获得的多抗血清对苯乙醇胺 A 具有较高的敏感性。

图 7 间接竞争 ELISA 检测 1 号小鼠苯乙醇胺 A IC_{50}

2.3.3 多抗血清特异性鉴定结果 如表 2 所示, 苯乙醇胺 A 的多抗血清与黄曲霉毒素 M_1 、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、伏马菌素 B_1 、呕吐毒素、新霉素药物的交叉反应率均小于 0.5%, 表明苯乙醇胺 A 对多抗血清有较好的特异性。

表 2 苯乙醇胺 A 的多抗血清与其他竞争物的交叉反应

化合物	$IC_{50}/(\text{ng/mL})$	交叉反应性/%
苯乙醇胺 A	536.8	100
伏马菌素 B_1	$>1.0 \times 10^4$	<0.5
呕吐毒素	$>1.0 \times 10^4$	<0.5
黄曲霉毒素 M_1	$>1.0 \times 10^4$	<0.5
玉米赤霉烯酮	$>1.0 \times 10^4$	<0.5
赭曲霉毒素 A	$>1.0 \times 10^4$	<0.5
新霉素	$>1.0 \times 10^4$	<0.5

3 讨论

3.1 苯乙醇胺 A 的改造方法的选择

苯乙醇胺 A 属于“瘦肉精”的一种, 与莱克多巴

胺、盐酸克伦特罗等瘦肉精很多性质都相似。鉴于苯乙醇胺 A 与沙丁胺醇都存在游离的羟基, 本研究借鉴沙丁胺醇的改造方法^[23], 采用琥珀酸酐法改造苯乙醇胺 A。

3.2 苯乙醇胺 A 抗原偶联方法的选择

苯乙醇胺 A 是小分子, 没有免疫原性, 只有将其与载体蛋白偶联后才能进行免疫。由于苯乙醇胺 A 分子构象中并没有含有羧基等易与载体蛋白相结合的基团, 因此本研究采用琥珀酸酐法在苯乙醇胺 A 上添加了一个羧基, 然后采用 DCC 法和 EDC 法进行偶联, 制备免疫抗原和检测抗原。采用单一方法进行偶联, 易产生假阳性反应, 如蛋白交联引起的免疫反应。本研究采用 2 种方法偶联, 尽量去除采用单一制备方法所引起的蛋白交联等反应, 减少反应副产物的生成, 提高效率。

3.3 苯乙醇胺 A 偶联物的鉴定

本研究采用紫外扫描法、SDS-PAGE 法和免疫学检测法这 3 种方法鉴定制备的苯乙醇胺 A 人工抗原。紫外扫描结果显示, 偶联后的苯乙醇胺 A-BSA 的最大特征吸收峰与 BSA、苯乙醇胺 A 均不重合; SDS-PAGE 结果显示, 偶联物苯乙醇胺 A-BSA 与 BSA 泳动速度不同, 条带迁移的位置也不同, 且偶联物的条带存在明显的拖尾现象; 对多抗血清进行鉴定发现, 制备的多抗血清敏感性高、特异性强。以上研究结果表明, 小分子苯乙醇胺 A 偶联载体蛋白成功。

本研究成功合成了苯乙醇胺 A 的免疫原和检测原, 获得了效价高、特异性好的多抗血清, 为下一步苯乙醇胺 A 单克隆抗体的筛选及苯乙醇胺 A 免疫学检测体系的建立奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 孙志文, 闫小峰. 猪肌肉组织中苯乙醇胺 A 残留液相色谱-串联质谱检测方法[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(4): 72-73.
- [2] Cao B, He G, Yang H, *et al.* Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for the detection of phenylethanolamine A in tissue and feed samples and confirmed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. Talanta, 2013, 115: 624-630.
- [3] Bai Y, Liu Z, Bi Y, *et al.* Preparation of polyclonal antibodies and development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of phenylethanolamine A in urine samples[J]. Journal of Ag-

- gricultural and Food Chemistry, 2012, 60 (46): 11618-11624.
- [4] 王瑞国, 苏晓鸥, 樊宇飞, 等. 新型“瘦肉精”苯乙醇胺致小鼠急性毒性试验研究[C]//中国毒理学会兽医毒理学与饲料毒理学学术讨论会暨兽医毒理专业委员会第4次全国代表大会会议论文集, 2012.
- [5] 张改平, 王选年, 肖肖. 瘦肉精的毒害作用及其试纸快速检测技术[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(5): 1-6.
- [6] 倪永付. 应对“变身”瘦肉精的策略选择[J]. 肉类工业, 2011(12): 48.
- [7] Sun Z, Yan X. The detection of phenylethanolamine A in porcine muscle tissue using liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. Chin J Vet Med, 2011, 47: 72-74.
- [8] Zhang M X, Li C, Wu Y L. Determination of phenylethanolamine A in animal hair, tissues and feeds by reversed phase liquid chromatography tandem mass spectrometry with QuEChERS[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 900: 94-99.
- [9] Su B X, Li J Z, Lin B, *et al.* Determination of phenylethanolamine A in livestock urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(5): 776-780.
- [10] 顾亮, 丁磊. 液相色谱串联质谱法测定饲料中盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、苯乙醇胺 A[J]. 化学分析计量, 2012, 21(1): 37-39.
- [11] 曲斌, 郑胜兰, 陆桂萍, 等. 固相萃取-UPLC-MS/MS 快速测定猪尿中的苯乙醇胺 A[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(1): 25-27.
- [12] 刘谦, 颜红. 液相色谱串联质谱测定动物肠衣中残留苯乙醇胺 A[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(8): 73-75.
- [13] Li Z, Wang Y, Kong W, *et al.* Ultrasensitive detection of trace amount of clenbuterol residue in swine urine utilizing an electrochemiluminescent immunosensor [C]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012.
- [14] 刘宣兵, 张改平, 邓瑞广, 等. 沙丁胺醇人工抗原的合成与鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(10): 22-25.
- [15] 陈经佳, 汪朝阳, 郑绿茵, 等. DCC 法合成胆甾醇酯[J]. 浙江化工, 2005, 36(2): 17-19.
- [16] 胡晓飞, 孙亚宁, 滕蔓, 等. 抗赭曲霉毒素 A 单克隆抗体的制备及鉴定[C]//第六次全国饲料营养学术研讨会论文集, 2010.
- [17] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Long Island: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [18] 王坤, 李清州, 胡晓飞, 等. T2 毒素人工抗原的合成及鼠源多克隆抗血清的制备[J]. 河南农业科学, 2013, 42(5): 158-162.
- [19] 李靓, 职爱民, 李青梅, 等. 盐酸金霉素人工抗原的合成及鼠源多抗血清的制备[J]. 河南农业科学, 2012, 41(7): 138-141.
- [20] 刘庆堂, 王磊, 职爱民, 等. 碳二亚胺法制备阿莫西林人工抗原及其鉴定[J]. 河南农业科学, 2012, 41(3): 142-145.
- [21] 柳爱春, 刘超, 桑丽雅, 等. 硝基呋喃类代谢物抗原合成及在胶体金试纸条上的应用[J]. 现代农业科技, 2012(23): 265-267.
- [22] Shelver W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Immunoassay, 2000, 21(1): 1-23.
- [23] 李春生, 吴萌, 李君华, 等. 沙丁胺醇人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(9): 122-125.