

强力霉素人工抗原的制备及鼠源多抗的 ELISA 鉴定

曹金博^{1,2}, 孟继秋^{1,2}, 李燕虹^{1,2}, 王耀², 孙亚宁¹, 胡晓飞¹

(1. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 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)

摘要: 为制备强力霉素(Doxycycline, DC)人工抗原并获得免疫学特性良好的DC鼠源多抗血清。本试验采用琥珀酸酐法在DC分子上引入羧基基团,然后采用改进碳二亚胺法(EDC)将其与载体蛋白偶联制备人工抗原,经紫外扫描(UV)和凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定其偶联效果,以30 μg/只的剂量(人工抗原)免疫4只BALB/c小鼠,并对所获鼠源多抗血清采用间接ELISA和间接竞争ELISA鉴定其免疫学特性。结果表明,人工抗原偶联效果良好,免疫的4只小鼠多抗血清效价均达到1:12800,且均有抑制效果,其中4号小鼠产生的多抗血清效果最佳,半数抑制浓度(IC₅₀)为24.75 ng/mL,与土霉素、金霉素、四环素的交叉反应率分别为3.4%、3.8%、3.0%,与其他兽药及载体蛋白的交叉反应率均小于0.3%,特异性良好。本试验成功合成DC人工抗原并获得免疫学特性良好的DC鼠源多抗血清,为后期单克隆抗体的制备及免疫学快速检测方法的建立奠定良好基础。

关键词: 强力霉素; 人工抗原; 多抗血清; ELISA

文章编号: 1673-9078(2019)12-182-188

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.024

Preparation of Artificial Antigen and ELISA Identification of Mouse

Polyclonal Antiserum for the Detection of Doxycycline

CAO Jin-bo^{1,2}, MENG Ji-qiu^{1,2}, LI Yan-hong^{1,2}, WANG Yao², SUN Ya-ning¹, HU Xiao-fei¹

(1. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

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

Abstract: To prepare complete antigen of doxycycline (DC) and obtain mouse polyclonal antiserum with good immunological characteristics, carboxyl groups were introduced into DC molecules by succinate method in this work. A Complete antigens were prepared by coupling with carrier proteins using an improved succinic acid method. The coupling effect of complete antigen was identified by UV and SDS-PAGE. Four BALB/c mouse were immunized with 30 μg artificial antigen, and the antiserum immunological characteristics were identified by indirect ELISA and indirect competitive ELISA. The results showed that the coupling effect of artificial antigen was good, the titer of antiserum of all four mouse were higher than 1:12800, the serum of all four mouse had inhibitory effect. The antiserum produced by mouse number 4 was the best. The inhibitory concentration (IC₅₀) was 24.75 ng/mL. The cross-reaction rates of OTC, CTC and TC of their homologues were 3.4%, 3.8% and 3.0%, respectively. The cross-reaction rate with other veterinary drugs and carrier protein was less than 0.3%, and had a good specificity. This study successfully synthesized DC artificial antigens and prepared DC antiserum with good immunological properties, which provided a good foundation for the preparation of monoclonal antibody and the establishment of immunology rapid detection method.

Key words: doxycycline; artificial antigen; polyclonal antiserum; ELISA

强力霉素(Doxycycline, DC),又名多西环素,是一

收稿日期: 2019-07-21

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2014BAD13B05); 国家重点研发计划项目(2018YFC1602903); 国家自然科学基金项目(31702218);

河南省自然科学基金项目(182300410038); 河南省科技攻关项目(182102110445; 182102310230); 河南省高等学校重点科研项目(18B550001); 河南省动物免疫学重点实验室开放课题(PKLA120170603)

作者简介: 曹金博(1994-),男,硕士研究生,研究方向: 食品安全快速检测

通讯作者: 胡晓飞(1972-),男,研究员,研究方向: 食品安全快速检测

种半合成的四环素类抗生素,分子量为444.44,分子式为C₂₂H₂₄N₂O₈,其化学结构式如图1所示。有研究表明^[1]DC可通过与核糖体的亚基结合,干扰细菌tRNA以及mRNA之间的相互作用,最终抑制细菌蛋白质的合成,从而起到抗菌的作用。四环素类抗生素价格低廉且具有广谱抗菌性,在禽畜及水产养殖中应用非常广泛。四环素类抗生素不仅可用于治疗禽畜各种感染性疾病,将其适量添加在动物饲料和饮水中还可起到预防疾病、促进生长的作用^[2-4]。但目前四环素类抗生素的违规滥用现象非常严重,导致其大量残留

在动物源性食品中,通过食物链在人体内蓄积后,将严重损害肝肾功能,同时还可引发呼吸道、尿道感染以及其他的不良反应,严重危害人类健康^[5,6]。因此,加大四环素类抗生素残留监管力度以及建立更加准确、快速、灵敏的检测方法尤为重要。

目前,关于四环素类抗生素残留的标准检测方法主要有高效液相色谱法^[7,8] (high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱法^[9] (gas chromatography, GC)、高效液相色谱-串联质谱法^[10] (gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)等仪器检测方法。该类检测方法具有准确度和灵敏度高、假阳性率和假阴性率低等优点,但存在仪器价格昂贵,需要专业操作人员,不适合大批量样品的快速筛查等局限^[11]。近年来,以酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)为代表的免疫分析技术因其灵敏度高、特异性强、操作简单以及适合样品的快速筛查等优点而被广泛应用于检测农兽药残留以及微量生物活性物质(细胞因子、酶、受体)等^[12-14]。免疫分析技术建立的关键在于制备免疫学特性良好的抗体,而目前虽有报道^[15]关于 DC 抗体的制备,但其敏感性和特异性均有待提高。本试验采用新方法(琥珀酸酐法和改进碳二亚胺法)成功合成 DC 人工抗原,并制备了敏感性和特异性更好的 DC 鼠源多抗血清,为其单克隆抗体的制备以及免疫学检测方法的建立奠定良好的基础。

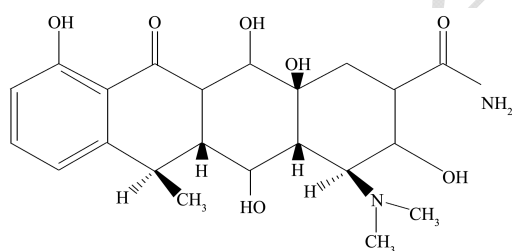


图1 DC 分子结构式

Fig.1 Molecular structure formula of DC

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

强力霉素(Doxycycline, DC)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、金霉素(Chlortetracycline, CTC)、四环素(Tetracycline, TC)、沙拉沙星(Sarafloxacin, SARA)、环丙氨嗪(Cyromazine, CA)

(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 1-(3-氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)、牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA), (Sigma 公司); 羊抗鼠酶标二抗(GaMlgG-HRP), (华美生物工程有限公司); Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, (北京索莱宝科技有限公司); ELISA 所用包被液(pH 9.6 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, CBS)、稀释液(pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, PBS)、洗涤液(含有 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液, PBST)、封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液)、显色液(TMB 磷酸-柠檬酸缓冲液)、终止液包被液(2 mol/L 的 H_2SO_4 溶液)等溶液均由实验室配置, 其他试剂均为市售分析级试剂。

1.1.2 仪器

ME204E 型电子天平, 德国 Mettler Toledo 公司; UV-5100H 型紫外-可见分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; ChemiDocTM XRS⁺ 型凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; 550 型酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 试验动物

6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠, 购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证编号: SCXK(鲁)2014-0007。

1.2 方法

1.2.1 DC 人工抗原合成

采用琥珀酸酐法^[16]和改进碳二亚胺法合成 DC 人工抗原, 合成路线如图 2 所示。称取 5.0 mg DC 和 3.0 mg 琥珀酸酐置于含有 4 mL 吡啶的圆底烧瓶中, 120 °C 避光回流加热 12 h, 用旋转蒸发器将吡啶旋干, 得 DC 改造物, 用 200 μ L N,N-二甲基甲酰胺(DMF)将其溶解。称取 5.7 mg EDC 和 3 mg NHS 溶于 1 mL 双蒸水中, 将用 DMF 溶解的 DC 改造物缓慢滴加其中, 调节 pH 为 4 左右, 室温避光活化 1 h。取 9.4 mg 的 BSA 溶于 2 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 将上述活化液缓慢滴加其中, 调节 pH 为 8 左右, 室温避光反应 4 h。最后将反应液转移至洁净透析袋中, 4 °C 条件下用 PBS 搅拌透析 3 d(每天换液 3 次), 透析结束后, 1000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀取上清得免疫抗原 DC-BSA, -20 °C 条件下保存备用。包被抗原 DC-OVA 制备方法同上。

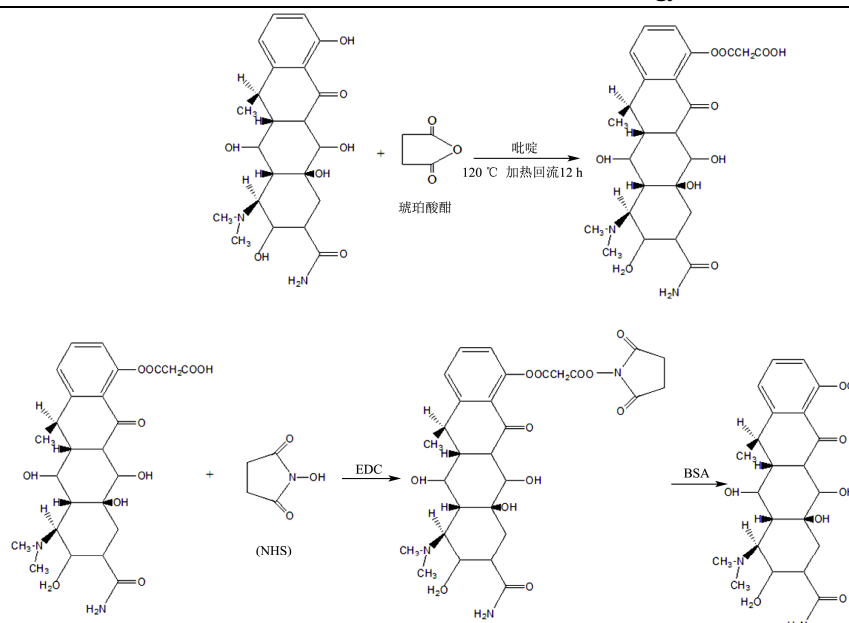


图2 DC-BSA 合成路线

Fig.2 The synthetic route of immunogen DC-BSA

1.2.2 DC 人工抗原鉴定

1.2.2.1 人工抗原蛋白浓度测定

将 1 mg/mL 的标准蛋白 BSA 按照 0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL 用 PBS 稀释液进行配制, 分别取 20 μ L 于 96 孔板中, 每孔加入 200 μ L 稀释后的 1 倍 G-250 染色液, 室温静置 3~5 min, 用酶标仪在 595 nm 波长下测定吸光值, 以蛋白质量浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标绘制标准曲线。以相同方法测定人工抗原吸光值, 带入标准曲线计算人工抗原浓度。

1.2.2.2 紫外扫描鉴定

用 PBS 配置与免疫抗原 DC-BSA 浓度一致的 DC 标准品溶液和 BSA 溶液, 利用紫外-可见分光光度计在 220~350 nm 波长范围内分别对其进行扫描, 得到紫外扫描图谱, 根据其特征峰变化判断其偶联效果, 包被抗原 DC-OVA 偶联效果鉴定同上。

1.2.2.3 SDS-PAGE 鉴定

参照相关文献^[17]选择浓缩胶体积分数为 5%, 电压为 90 V, 分离胶体积分数为 12%, 电压为 60 V, 样品加入量为 10 μ L (DC-BSA 含量分别为 2、3、4 μ g, BSA 含量为 5 μ g), 用考马斯亮蓝染色液染色 6 h, 乙酸脱色液脱色 6 h (每 2 h 换一次脱色液), 通过凝胶成像系统拍照, 通过对比 DC-BSA 和 BSA 条带位置差异判断偶联效果。包被抗原 DC-OVA 偶联效果鉴定方法同上。

1.2.3 DC 多抗血清的制备与鉴定

选择 4 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 首免为基础免疫, 用高压灭菌的 PBS 稀释免疫原 DC-BSA, 并与

等体积的 FCA 混合, 乳化器充分乳化后, 以 200 μ L/只 (含 DC-BSA 30 μ g) 的剂量采用背部皮下多点注射方法免疫, 后三次为加强免疫, 用 FIA 代替 FCA, 每次免疫间隔 3 周。免疫结束后 10 d 断尾采血, 用 PBS 稀释 100 倍, 2000 r/min 离心 10 min, 去除沉淀取血清冷冻备用。

1.2.3.1 DC 多抗血清效价测定

采用间接 ELISA 法^[18]。用 CBS 将包被抗原 DC-OVA 稀释至 2 μ g/mL, 每孔 50 μ L 包被于 96 孔聚苯乙烯板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBST 洗板后每孔加 100 μ L 封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。取已包被抗原的聚苯乙烯板, 加入倍比稀释的多抗血清并设置空白对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 洗板后加入用封闭液稀释 1000 倍的 GaMlg G-HRP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗板后加入显色液, 室温避光显色 10 min 后加终止液终止显色并读取 OD_{450 nm} 值, 当 OD_{450 nm}/空白孔 OD_{450 nm} $\geq$ 2.1 时, 判定为阳性孔。

1.2.3.2 DC 多抗血清敏感性鉴定

采用间接竞争 ELISA 法^[19]。取已包被 DC-OVA 的聚苯乙烯板, 每孔加入 50 μ L 不同浓度梯度的 DC 标准品溶液和 50 μ L 效价测定时 OD_{450 nm} 值为 1.0 左右所对应稀释度的多抗血清, 并设置空白对照, 其他步骤与间接 ELISA 操作方法相同。以 B/B₀ 为纵坐标 (其中 B 为标准品不同浓度下的 OD_{450 nm} 值, B₀ 为标准品浓度为零时的 OD_{450 nm} 值), 以标准品浓度的对数值为横坐标, 绘制抑制曲线, 得到线性回归方程, 并以半数抑制浓度 (IC₅₀) 来评定多抗血清敏感性。

1.2.3.3 DC 多抗血清特异性鉴定

选择 OTC、CTC、TC、SARA、CA、BSA、OVA 作为竞争物,利用间接竞争 ELISA 法测定各竞争物对多抗血清的 IC_{50} 。以 DC 的 IC_{50} 与各竞争物的 IC_{50} 的百分比作为交叉反应率,交叉反应率越低,则说明特异性越强^[20]。

1.3 数据处理

对所得的数据利用 Excel 2003 进行处理(包括回归分析和显著性检验),对分子结构式及合成路线图用 Chem Draw Pro 18.0 进行绘制。

2 结果与分析

2.1 DC 人工抗原鉴定

2.1.1 人工抗原蛋白浓度测定

图 3 为用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒所测蛋白浓度标准曲线,根据标准曲线计算免疫抗原 DC-BSA、包被抗原 DC-OVA 的蛋白质量浓度分别为 4.5 mg/mL、4.1 mg/mL。

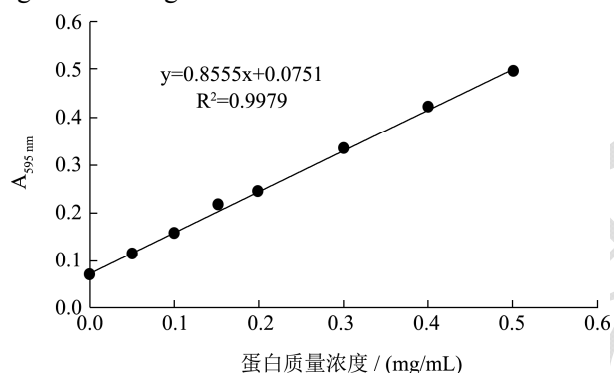


图 3 蛋白质浓度标准曲线

Fig.3 Standard curve for protein concentration

2.1.2 紫外扫描

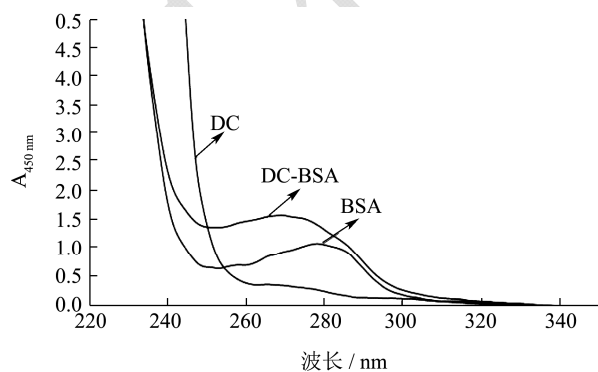


图 4 DC-BSA、BSA、DC 紫外扫描图

Fig.4 UV scanning spectrum of DC-BSA, BSA, DC

利用紫外扫描法对人工抗原进行初步鉴定,图 4 为 DC、DC-BSA 和 BSA 紫外扫描图谱,可以看出 BSA 的特征吸收峰出现在 278 nm 处,DC 无明显特征吸收

峰,DC-BSA 的特征吸收峰相比 BSA 向左发生明显偏移,初步证明 DC 和 BSA 偶联成功。图 5 为 DC、DC-OVA、和 OVA 紫外扫描图谱,同样证明 DC 和 OVA 偶联成功。

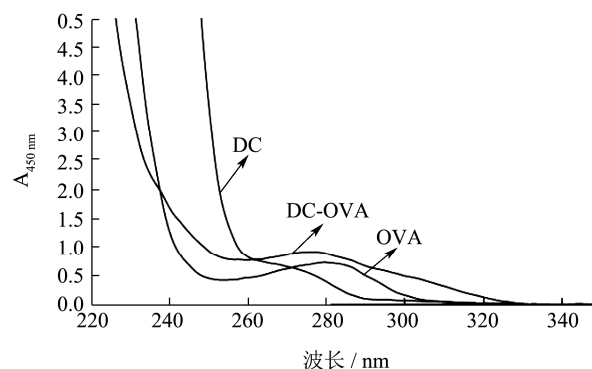


图 5 DC-OVA、OVA、DC 紫外扫描图

Fig.5 UV scanning spectrum of DC-OVA, OVA, DC

2.1.3 SDS-PAGE 鉴定

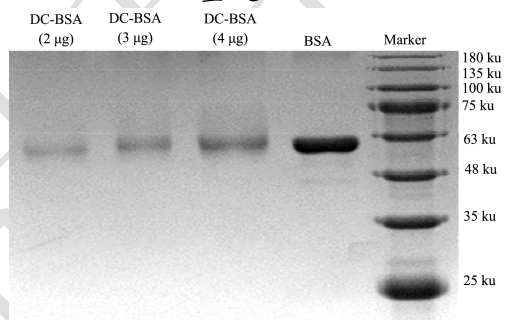


图 6 DC-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig.6 SDS-PAGE identification results of DC-BSA

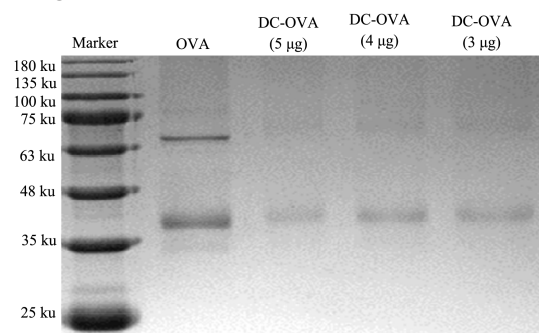


图 7 DC-OVA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

Fig.7 SDS-PAGE identification results of DC-OVA

采用 SDS-PAGE 对人工抗原进行进一步鉴定,图 6 为 DC-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果,可以看出 DC-BSA 电泳条带位移小于 BSA,产生明显拖尾现象,表明 DC-BSA 分子量大于 BSA,偶联产生较好效果。图 7 为 DC-OVA 的 SDS-PAGE 鉴定结果,同样证明 DC 和 OVA 偶联成功。

2.2 多抗血清鉴定

2.2.1 效价测定

表 1 为 DC 多抗血清效价测定结果,可以看出 4 只免疫小鼠多抗血清效价均达到 1:12800, 其中 4 号小鼠达到 1:25600, 说明合成的免疫抗原具有较好的免疫效果。

表 1 DC 多抗血清效价测定结果

Table 1 The titers of DC antiserum (n=3)

多抗稀释倍数	1 号小鼠	2 号小鼠	3 号小鼠	4 号小鼠
200	1.12	1.92	2.10	2.25
400	0.73	1.27	1.73	1.89
800	0.75	0.69	0.96	1.29
1600	0.57	0.57	0.65	0.98
3200	0.37	0.45	0.48	0.78
6400	0.26	0.21	0.31	0.54
12800	0.13	0.16	0.2	0.35
25600	0.11	0.14	0.17	0.27
空白对照	0.06	0.08	0.08	0.08

2.2.2 敏感性鉴定

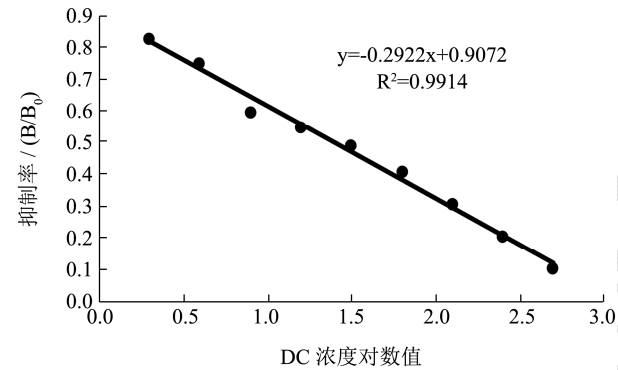


图 8 4 号小鼠多抗血清抑制曲线

Fig.8 The inhibitive curve of No.4 mouse antiserum

表 2 DC 多抗血清间接竞争 ELISA 测定结果

Table 2 Indirect competitive ELISA of DC antiserum (n=3)

DC 标品浓度/(ng/mL)	1 号小鼠	2 号小鼠	3 号小鼠	4 号小鼠
500	0.18	0.27	0.23	0.11
250	0.2	0.31	0.29	0.21
125	0.30	0.35	0.31	0.32
62.50	0.3	0.40	0.42	0.42
31.25	0.41	0.43	0.54	0.5
15.63	0.53	0.51	0.62	0.55
7.81	0.65	0.60	0.68	0.63
3.90	0.75	0.48	0.82	0.79
1.95	0.80	0.71	0.86	0.87
0	0.82	0.9	1.02	1.05
空白	0.07	0.08	0.08	0.06

表 2 为 DC 多抗血清间接竞争 ELISA 测定结果,

可以看出免疫的 4 只小鼠所产生的多抗血清均有抑制效果, 其中 4 号小鼠多抗血清效果最好, 其抑制曲线如图 8 所示, 线性回归方程为 $y=-0.2922x+0.9072$, R^2 为 0.9914, IC_{50} 为 24.75 ng/mL, 结果表明制备的 DC 多抗血清敏感性较好。

2.2.3 特异性鉴定结果

表 3 为 DC 多抗血清特异性鉴定结果, 可以看出 DC 与其同系物 OTC、CTC、TC 存在微弱的交叉, 交叉反应率分别为 3.4%、3.8%、3.0%, 与其他兽药及载体蛋白的交叉反应率均小于 0.3%, 说明制备的多抗血清具有较强的特异性。

表 3 DC 多抗血清与竞争物的交叉反应

Table 3 The cross-reactivity of DC antiserum with other compounds

竞争物 Competimer	$IC_{50}/(ng/mL)$	交叉反应率/%
DC	24.75	100
OTC	720.50	3.4
CTC	650.56	3.8
TC	820.25	3.0
CA	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
SARA	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
BSA	$>1.0 \times 10^4$	<0.3
OVA	$>1.0 \times 10^4$	<0.3

3 结论

3.1 DC 属于小分子半抗原, 本身不具有免疫原性, 需偶联到载体蛋白上才可刺激机体产生相应抗体, 分析 DC 分子结构式, 从酰胺基和酚羟基考虑, 可采用戊二醛 (GA) 法、碳二亚胺 (EDC) 法、偶氮苯甲酸法等方法将 DC 偶联到载体蛋白上。然而 GA 法容易使分子间发生自连, 影响小分子抗原决定簇充分暴露, 进而影响免疫效果, 李楠^[21]采用 GA 法并未获得免疫学特性良好的抗体。余少梅^[22]采用 EDC 法所获单克隆抗体的 IC_{50} 为 44.46 ng/mL, 与 TC、OTC 的交叉反应率分别为 8.87%、5.86%。刘金萍^[23]用偶氮苯甲酸法所获单克隆抗体 IC_{50} 为 126.5 ng/mL, 与 TC、OTC 存在较大交叉反应率, 敏感性和特异性有待提高。本试验首次采用琥珀酸酐法对 DC 进行改造引入羧基基团, 然后采用改进 EDC 法合成人工抗原。通过免疫小鼠所获多抗血清 IC_{50} 为 24.75 ng/mL, 与 OTC、CTC、TC 存在微弱的交叉, 相比前人研究, 其敏感性和特异性更好, 而一般通过细胞融合制备的单抗灵敏度要比多抗血清提高 10 倍甚至更高, 所以本试验将获得灵敏度更高, 特异性更好的单克隆抗体。

3.2 本试验选择 BSA 作为 DC 免疫抗原载体蛋白,

OVA 作为包被抗原载体蛋白, BSA 分子中含有大量的游离氨基, 且具有很好的溶解性, 有利于偶联过程的进行, 同时 BSA 分子上抗原决定簇较少, 可一定程度上减少无关抗体的产生。OVA 和 BSA 在结构上存在较大差异, 具有较远的亲缘关系, 在敏感性及特异性实验中, 可避免因载体蛋白产生的抗体对实验结果的准确性产生的不良影响。

3.3 人工抗原合成之后, 通常先采用物理方法对其进行初步鉴定, 如紫外扫描 (UV)、红外扫描 (IR)、核磁共振碳谱 (^{13}C -NMR)、SDS-PAGE 凝胶电泳等。

^{13}C -NMR 法和 IR 法可准确对人工抗原的化学结构及基团进行分析, 但操作繁琐、价格昂贵, 且需要图谱分析。UV 和 SDS-PAGE 凝胶电泳法虽准确性不及前者, 但操作简单。本试验采用 UV 法和 SDS-PAGE 凝胶电泳法初步鉴定 DC 人工抗原偶联成功, 但判断偶联是否成功还需免疫小鼠之后, 根据能否产生 DC 特异性抗体进行判断。

3.4 本试验采用琥珀酸酐法和改进碳二亚胺法成功合成 DC 人工抗原, 所制备的鼠源多抗血清效价均达到 1:12800, 其中 4 号小鼠多抗血清敏感性最好, IC_{50} 为 24.75 ng/mL, 与 OTC、CTC、TC 存在微弱交叉反应, 交叉反应率分别为 3.4%、3.8%、3.0%, 与其他兽药及载体蛋白的交叉反应率均小于 0.3%, 敏感性和特异性良好, 为 DC 单克隆抗体的制备及其免疫学快速检测方法的建立奠定了良好基础。

参考文献

- [1] Yadav M, Parle Milind, Sharma Nidhi, et al. Brain targeted oral delivery of doxycycline hydrochloride encapsulated Tween 80 coated chitosan nanoparticles against ketamine induced psychosis: behavioral, biochemical, neurochemical and histological alterations in mouse [J]. *Drug Delivery*, 2017, 24(1): 1429-1440
- [2] WANG Hai-bo, LI Yang, BAI Hong-yu, et al. Development of rapid and label-free fluorescence sensing of tetracyclines in milk based on poly (Adenine) DNA-templated Au nanoclusters [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(11): 3095-3102
- [3] Devirgiliis C, Barile S, Caravelli A, et al. Identification of tetracycline- and erythromycin-resistant Gram-positive cocci within the fermenting microflora of an Italian dairy food product [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2017, 109(1): 313-323
- [4] CHEN Yan-ni, KONG De-zhao, LIU Li-qiang, et al. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody [J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(4): 905-914
- [5] Alcock R E, Sweetman A, Jones K C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: Selected compounds and physicochemical properties [J]. *Chemosphere*, 1999, 38(10): 2 247-2 262
- [6] ZHAN Xue-jia, HU Guang-zhi, ZHAN Shen-shan, et al. Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(2): 723-729
- [7] YANG Jian-wen, WANG Zong-nan, ZHOU Tong, et al. Determination of cyproheptadine in feeds using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC [J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 990: 39-44
- [8] YANG Fang, LIU Zhen-cai, LIN Yong-hui, et al. Development an UHPLC-MS/MS method for detection of β -agonist residues in milk [J]. *Food Analytical Methods*, 2012, 5(1): 138-147
- [9] Karamolegou F, Dasenaki M, Belessi V, et al. Multi-residue determination of 7 β -agonists in liver and meat using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Analytical Methods*, 2018:1-18
- [10] Śniegocki T, Posyniak A, Żmudzki J. Improved gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol and salbutamol in animal urine [J]. *Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy*, 2005, 49(4): 443-447
- [11] Fredericksen R J, Mayer K H, Gibbons L E, et al. Development and content validation of a patient-reported sexual risk measure for use in primary care [J]. *Journal of General Internal Medicine*, 2018, 33(10): 1661-1668
- [12] Topno R, Khan, Siraj Ahmed, et al. Pharmacodynamics of aminoglycosides and tetracycline derivatives against Japanese encephalitis virus [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2016, 9(3): 241-246
- [13] HU Song, LI Dan-hong, HUANG Zhen, et al. Ultra-sensitive method based on time-resolved fluorescence immunoassay for detection of sulfamethazine in raw milk [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 1 137-1 149
- [14] GUO Meng-yuan, SUN Li, LIU Li-qiang, et al. Ultrasensitive immunochromatographic strip for detection of

- cypheptadine [J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 941-952
- [15] 甘金华,邓薇,李进平,等.强力霉素人工抗原的合成与抗体制备[J].食品与生物技术学报,2011,30(2):316-320
GAN Jin-hua, DENG Wei, LI Jin-ping, et al. Synthesis of artificial antigen and preparation of polyclonal antiserum for doxycycline [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(2): 316-320
- [16] 蔡齐超,胡晓飞,侯玉泽,等.苯乙醇胺 A 人工抗原的制备与鉴定[J].河南农业科学,2014,43(7):150-155
CAI Qi-chao, HU Xiao-fei, HOU Yu-ze, et al. Preparation and identification of phenylethanolamin A artificial antigen [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2014, 43(7): 150-155
- [17] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999: 56-60
GUO Yao-jun. Experimental Techniques for Protein Electrophoresis [M]. Beijing: science press, 1999: 56-60
- [18] SUN Ya-ning, YANG Ji-fei, YANG Su-zhen, 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
- [19] WANG Yao, LI Zhao-zhou, PEI Ya-feng, et al. Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of soybean allergen β -conglycinin [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2429-2435
- [20] ZHANG Yan, YANG Jin-yi, LEI Hong-tao, et al. Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of malachite green in seafood [J]. Food and Agricultural Immunology, 2015, 26(2): 204-217
- [21] 李楠.强力霉素单克隆抗体的制备及其快速检测试剂条的研究[D].烟台:鲁东大学,2016
LI Nan. The study of preparation of doxycycline monoclonal antibody and its rapid detection strip [D]. Yantai: Ludong University, 2016
- [22] 余少梅.强力霉素单克隆抗体的制备及其初步应用研究[D].武汉:华中农业大学,2012
YU Shao-mei. Study on preparation of monoclonal antibody against doxycycline and its preliminary application [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012
- [23] 刘金萍.强力霉素单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[D].扬州:扬州大学,2016
LIU Jin-ping. Preparation of Monoclonal Antibody against doxycycline and establishment of an ELISA method [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016

(上接第 309 页)

- [18] Xiang D, Wang C G, Wang W Q, et al. Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an *in vitro* investigation [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2017, 68: 704-711
- [19] 陈业,罗祖友,向东山.藤茶黄酮类化合物的提取分离与定量方法研究进展[J].湖北民族学院学报(自然科学版),2008, 26(3):277-281
CHEN Ye, LUO Zu-you, XIANG Dong-shan. Progress on extraction and isolation and quantitative methods of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Science Edition), 2008, 26(3): 277-281
- [20] 郭亚健,范莉,王晓强,等.关于 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J].药物分析杂志,2002,2:97-99
GUO Ya-jian, FAN Li, WANG Xiao-qiang, et al. Discussion about NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH colorimetry for determination of total flavonoids [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2002, 2: 97-99
- [21] 耿艳艳,郭爱秀,金苏英,等.藤茶的功效及其应用研究进展[J].饮料工业,2019,22(1):71-74
GENG Yan-yan, GUO Ai-xiu, JIN Su-ying, et al. Research progress in effect and use of vine tea [J]. Beverage Industry, 2019, 22(1): 71-74
- [22] 成桂凤,欧知义.鄂西藤茶中总黄酮的提取及含量测定[J].中南民族大学学报(自然科学版),2005,24(2):19-22
CHENG Gui-feng, Ou Zhi-yi. Extraction and determination of total flavonoid in *A. Megalophylla* Diels of exi [J]. Journal of South-central College For Nationalities (Natural Sciences), 2005, 24(2): 19-22
- [23] 刘尧,谢嘉馨,王磊.稻壳中总黄酮的提取工艺及其稳定性研究[J].粮食与油脂,2019,32(5):7-10
LIU Yao, XIE Jia-xin, WANG Lei. Study on ultrasonic-assisted extraction of total flavones from paddy hull and its stability [J]. Cereals & Oils, 2019, 32(5): 7-10