

醋酸甲羟孕酮人工抗原的合成与鉴定

杨泽晓¹,张彦明¹,韩雪清²,林祥梅²,侯义宏¹,黄 新³

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;2 中国检验检疫科学研究院 北京 100029;3 清华大学 化学工程系,北京 100084)

【摘要】【目的】为建立醋酸甲羟孕酮(MPA)快速准确的免疫学分析技术,对 MPA 人工抗原的合成鉴定进行研究。【方法】将 MPA 腓化后与琥珀酸酐反应制得 MPA 半琥珀酸(MPA-HS),然后通过碳二亚胺法将 MPA-HS 与牛血清白蛋白(BSA)偶联合成人工抗原 MPA-BSA,并采用紫外全波长扫描法、SDS-PAGE 法、ELISA 检测法和动物免疫试验对其进行鉴定。【结果】MPA 与 BSA 的偶联比为 8 : 1 时,合成的人工抗原 MPA-BSA 具有良好免疫原性与反应原性。【结论】成功合成了人工抗原 MPA-BSA,为进一步的 MPA 免疫学分析技术研究奠定了基础。

【关键词】 醋酸甲羟孕酮;半抗原;人工抗原;合成与鉴定

【中图分类号】 Q939.91;S851

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)02-0039-06

Synthesis and identification of artificial antigen for Medroxyprogesterone Acetate

YANG Ze-xiao¹,ZHANG Yan-ming¹,HAN Xue-qing²,LIN Xiang-mei²,
HOU Yi-hong¹,HUANG Xin³

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China;

3 Department of Chemical Engineering of Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: 【Objective】 This study was to develop a rapid and sensitive technology for the detection of Medroxyprogesterone Acetate(MPA). The artificial antigen of MPA was synthesized and identified in the study. 【Method】 MPA hemi hemi-succinate (MPA-HS) was produced by the oximation reaction of MPA with the reaction between oximinooximated-MPA and with succinic anhydride, then the hapten MPA-HS was conjugated to protein carrier BSA by using the coupling agent diisopropylcarbodiimide, and the synthesized antigen MPA-BSA was identified by full-wavelength the ultraviolet full wavelength scanner, SDS-PAGE, ELISA test and animal-inoculation immunization test. 【Result】 The results showed that the synthesis synthesized antigen MPA-BSA with good immunogenicity and reactogenicity antigenicity, and the optimized conjugation molecular ratio of coupling reaction was determined to be 8 : 1. 【Conclusion】 The synthesis of artificial antigen MPA-BSA set basis for the study of the immunology detection technology of MPA.

Key words: Medroxyprogesterone Acetate; hapten; artificial antigen; synthesis and identification

* [收稿日期] 2007-01-31

[基金项目] 国家质检总局科研项目(2006IK017)

[作者简介] 杨泽晓(1980—),男,河南南阳人,在读博士,主要从事动物疫病防治与兽医公共卫生学研究。
E-mail: yzxyang2003@126.com

[通讯作者] 韩雪清(1962—),女,甘肃兰州人,研究员,主要从事病原微生物分子生物学、免疫学及检验检疫技术研究。
E-mail: hanxueq@yahoo.com.cn

近年来,欧洲动物饲料污染事件时有发生,刚发生致癌除草剂污染鸡饲料事件,又爆出醋酸甲羟孕酮(Medroxyprogesterone Acetate, MPA)污染事件。而激素 MPA 污染持续的时间长、涉及产品多、影响范围广,到目前为止,已波及到欧盟 15 个成员国中的 11 个国家,其影响还在不断扩大中,欧盟则已明令严禁使用 MPA。MPA 污染事件再一次引起了人们对食品安全和公共卫生问题的极大忧虑^[1],我国政府相关部门对此事已给予高度的重视。

MPA 是一种孕激素类药物,为黄体酮衍生物,化学名为,6 α -甲基-17 α -羟基孕甾-4-烯-3,20-二酮醋酸酯,分子式为 C₂₄H₃₄O₄,又称甲羟孕酮、甲孕酮、安宫黄体酮,其作用用途与黄体酮相似,临床上主要用于人的流产、痛经、闭经、子宫出血等的治疗及作为长效避孕药。在家畜和野生动物中,MPA 被作为促生长剂广泛用于动物的增肥、非发情期诱导发情、诱发超数排卵和同步发情等,以提高繁殖率和经济效益。但 MPA 具有很多的毒副作用,能引起不规则出血、闭经、体重改变、精神抑郁、失眠、恶心、乳胀等不良反应,甚至引起不孕不育症。MPA 的不合理应用不仅给养殖业带来重大经济损失,而且导致动物性食品中该药的残留,进而对人类健康构成极大的威胁。

据悉,在一些国家还允许在动物中使用 MPA^[1],为加强检验检疫工作,有效地将 MPA 污染的食品、饲料等产品拒在国门之外,并对我国出口欧盟的有关产品进行甲羟孕酮、甲地孕酮等激素的检验,以免造成不必要的经济损失,建立对有关产品中 MPA 的检测方法是当务之急。目前,国外在对 MPA 的检测方面已经进行了较多研究^[2-4],并生产出相应检测试剂盒(如 Medroxyprogesterone Acetate EIA Kit, 5131MPA1p[3]08.05),而国内在这方面研究甚少,因此开发我国自主知识产权的 MPA 残留检测方法非常必要。免疫学分析方法具有检测快速、敏感性高、特异性强等特点,样品处理简单,又便于现场监控,因此具有重要的现实意义。要建立相关免疫学分析方法,制备出特异性强、效价高的 MPA 抗体非常关键,但是 MPA 分子量仅有 383.44 u,不具免疫原性,只有与大分子载体蛋白偶联成为完全抗原,才能刺激动物机体发生特异性免疫反应。为此,本试验对 MPA 人工抗原的合成与鉴定进行了研究,以期对 MPA 残留检测方法的建立提供研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 醋酸甲羟孕酮(MPA)CAS 71-58-9、牛血清白蛋白(BSA)、水溶性碳化二亚胺(EDCI)、福氏完全佐剂(CFA)和福氏不完全佐剂(IFA),均为 Sigma 公司产品;盐酸羟胺(分析纯)、三乙胺和琥珀酸酐,均购自上海化学试剂站;丙烯酰胺(Acr)、甲叉双丙烯酰胺(Bis-Acr)、甘氨酸(Glycine)、考马士亮兰 R-250、TMEDM 和 2-ME,均购自北京鼎国生物科技有限公司;低分子蛋白 Marker 购自中国科学院上海生物化学研究所;N,N-二甲基甲酰胺(分析纯)为无锡中西药品集团有限公司产品;MPA 检测试剂盒 Medroxyprogesterone Acetate EIA Kit (5131MPA1p[3]08.05),购自中国检验检疫科学研究院北京陆桥技术有限责任公司。

1.1.2 仪器 ND-1000 紫外分光光度计,美国 NanoDrop 技术有限公司产品;Millipore Elix^R Milli-Q^R BiocelTM超纯水系统,Bio-Rad 产品;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂;Sartorius 电子天平(BS224S),五州东方公司产品;酶标仪(Multiskan Ascent 150754 0),上海 Thermo 公司产品;台式微电脑酸碱度和温度测量计(pH211 Microprocessor pH Meter),北京哈纳科仪科技有限公司;FTS EI585-Q 冷冻干燥仪,STONE RIDGG USA 公司产品。

1.1.3 试验动物 Balb/c 小鼠 12 只,由中国检验检疫科学研究院李桂芬老师馈赠。

1.2 人工抗原 MPA-BSA 的合成

用 Sartorius 电子天平称取 85 mg MPA 和 21 mg 盐酸羟胺,分别溶于 20 mL 无水乙醇与 10 mL 双蒸水,然后将这两种溶液混合,在冰浴条件下反应 2.5 h,反应过程中滴入 0.05 mol/L NaOH 溶液约 7 mL,反应后再滴入醋酸盐缓冲液 5 mL,并加入碎冰约 25 mg,生成的白色沉淀为胍化 MPA(HON=MPA),在 4℃下静置 1~2 d。将反应液于 3 000 g 离心 20 min,弃上清液,取出白色沉淀用 20 mL 二甲基甲酰胺溶解后,加入 50 mg 琥珀酸酐,室温反应 2 h,随后加入三乙胺 100 μ L,继续反应 1 h,得酰化产物。

称取 500 mg BSA,溶于 10 mL 0.01 mol/L PBS(pH 8.0)溶液中,加入 100 mg EDCI,然后逐滴滴加上述酰化产物,反应 1 h 后,再加 50 mg EDCI,暗处搅拌反应过夜。收集反应液用双蒸水透析 2 d,

此过程换液3~5次,然后置于FTS EI585-Q冷冻干燥仪中冷冻干燥,保存于-70℃冰箱备用。

1.3 人工抗原 MPA-BSA 的鉴定

1.3.1 紫外线全波长扫描法鉴定^[5-6] 用超纯水分别溶解BSA、MPA和MPA-BSA,配制成一定浓度溶液,在ND-1000紫外分光光度计进行测量,记录结果。

根据公式 $K=A/CL$ (其中 K 为摩尔消光系数; A 为光吸收值,即OD值; C 为浓度; L 为光程),计算BSA与MPA在相应波长处的摩尔消光系数,代入公式 $C_1/C_2=(AC_{am} \times K'_b - AC_{bm} \times K'_a)/(AC_{bm} \times K_a - AC_{am} \times K_b)$,计算MPA与BSA的偶联比。

式中, C_1/C_2 为MPA与BSA的浓度比, a 、 b 分别为MPA与BSA的最大特征紫外吸收光峰, AC_{am} 、 AC_{bm} 分别为MPA-BSA在 a 、 b 光峰处的光吸收值, K_a 、 K_b 分别为MPA在 a 、 b 光峰处的摩尔消光系数, K'_a 、 K'_b 为BSA在 a 、 b 光峰处的摩尔消光系数。

1.3.2 SDS-PAGE法鉴定 按照参考文献[7]的方法进行操作,配制相关试剂,用120 g/L的分离胶(5 mL)、50 g/L的积层胶溶液(1 mL)制胶;取一定量BSA和MPA-BSA,均用超纯水稀释至终浓度为120 μ g/mL,加入等体积SDS Loading Buffer(2 $\times$),水浴煮沸5~10 min,作为待检样品;小心移去梳子,在电泳装置上、下槽间加入SDS-PAGE电泳缓冲液,用微量加样器每孔上样20 μ L;打开电源,积层胶用80 V电压,当溴酚蓝进入分离胶后,将电压提高至120 V,继续电泳至溴酚蓝到达凝胶底部为止;小心取下凝胶,室温条件下考马斯亮蓝染色1.5~2.0 h;再置于脱色摇床上脱色至蓝色背景完全脱净,将凝胶浸入蒸馏水中终止脱色;在凝胶成像系统中拍照保存并进行分析。

1.3.3 ELISA法检测 称取适量合成抗原MPA-BSA溶于超纯水使其质量浓度为120 μ g/mL,再依次倍比稀释,使其质量浓度分别为60,30,15,7.5,3.75和1.875 μ g/mL,分别编号为S1、S2、S3、S4、S5、S6和S7,根据MPA检测试剂盒Medroxyprogesterone Acetate EIA Kit (5131MPA1p[3]08.05)说明书操作,设定量阳性对照PC1~PC6,其对应的MPA质量浓度分别为40,20,4.0,2.0,1.0和0.2 ng/mL,以MPA检测试剂盒提供的稀释液作为阴性对照(NC),进行合成抗原MPA-BSA中MPA的反应原性检测。

1.3.4 动物免疫试验 在灭菌离心管中,称取0.5 mg BSA溶于0.5 mL灭菌生理盐水中,加入等体积CFA,震荡混匀直至形成白色油包水型乳浊液,制成溶液I。称取1.0 mg BSA溶于0.5 mL灭菌生理盐水中,加入等体积IFA,震荡混匀直至形成白色油包水型乳浊液,制成溶液II。称取0.5 mg MPA-BSA溶于0.5 mL灭菌生理盐水中,加入等体积CFA,震荡混匀直至形成白色油包水型乳浊液,制成溶液III。称取0.5 mg MPA-BSA溶于0.5 mL灭菌生理盐水中,加入等体积IFA,震荡混匀直至形成白色油包水型乳浊液,制成溶液IV。取12只Balb/c小鼠,随机分为A、B、C和D4组,每组3只。首次免疫:A组,腹腔注射灭菌生理盐水0.2 mL/只;B组,腹腔注射溶液I 0.2 mL/只;C组和D组,腹腔注射溶液III 0.2 mL/只。15 d后进行第二次免疫:A组,腹腔注射灭菌生理盐水0.2 mL/只;B组,腹腔注射溶液II 0.2 mL/只;C组和D组,腹腔注射溶液IV 0.2 mL/只。第二次免疫10 d后取C组小鼠摘除眼球采血,制备血清于-20℃保存备用,15 d后其他各组按照第二次免疫进行加强免疫。加强免疫10 d后摘除小鼠眼球采血,制备血清,与小鼠编号对应,将其分别编号A、B、C和D。

取适量血清,依次作1:1,1:5,1:10,1:100,1:500,1:1 000,1:2 000,1:4 000,1:8 000,1:12 000,1:14 000,1:16 000,1:18 000和1:20 000稀释。根据竞争ELISA原理,改组MPA检测试剂盒Medroxyprogesterone Acetate EIA Kit (5131MPA1p[3]08.05)对小鼠抗MPA抗体进行检测,操作步骤:(1)在空白调零孔加入100 μ L稀释液,阴性对照孔(NC)加入50 μ L稀释液(MPA检测试剂盒提供),检测样品孔加入50 μ L待检血清样品。(2)除空白调零孔外,其他孔各加入25 μ L抗体(兔抗MPA)溶液和25 μ L MPA-HRPO(酶标MPA连接液)。(3)封上板子,振摇2 min,37℃避光孵育1 h。(4)弃去反应液,用300 μ L Rinsing Buffer洗涤,每孔3次,最后在吸水纸上拍干板子。(5)每孔加入100 μ L底物溶液,20~25℃避光孵育30 min。(6)每孔加入100 μ L终止液,立即在波长450 nm下测定OD值(对照和每个检测样品每次做2孔,结果取平均值)。

2 结果与分析

2.1 MPA-BSA的紫外线全波长扫描鉴定结果

取产物MPA-BSA、MPA和BSA分别配制成

质量浓度为 500 ,50 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 溶液,用 ND-1000 紫外分光光度计进行测量,得到相应的紫外线吸收光谱图(图 1)。

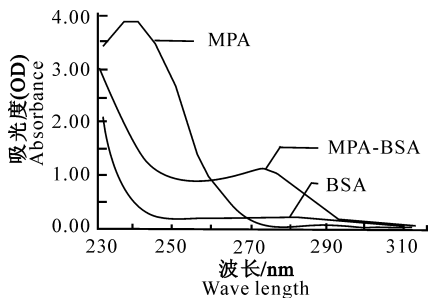


图 1 MPA、BSA、MPA-BSA 的紫外线吸收光谱图

Fig.1 Ultraviolet absorbance spectrum of MPA, BSA and MPA-BSA

由图 1 可知,MPA、BSA 和 MPA-BSA 最大特征吸收峰波长分别为 240,277 和 273 nm,与 MPA、BSA 相比,MPA-BSA 最大特征吸收峰发生了位移,表明 MPA 已被偶联到载体 BSA 上;MPA 和 BSA 在其最大特征吸收峰的 OD 值分别为 3.871 和 0.312;MPA-BSA 在 240 与 277 nm 波长处 OD 值分别为 1.682 和 1.026;将上述数据代入公式 $K = A/CL$ 与 $C_1/C_2 = (AC_{am} \times K'_b - AC_{bm} \times K'_a) / (AC_{bm} \times K_a - AC_{am} \times K_b)$ 计算出 MPA 与 BSA 的偶联比为 8 : 1。

2.2 MPA-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

MPA-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果如图 2 所示。根据人工抗原 MPA-BSA 和原载体蛋白质 BSA 的

条带位置变化可以判断出抗原 MPA-BSA 的合成是成功的;合成抗原 MPA-BSA 迁移速度较载体蛋白 BSA 慢,且 MPA-BSA 条带在 68.4 ku 附近(图 2),由蛋白质分子的相对迁移率(分子量大小)可估算 MPA 与 BSA 偶联比为 8 : 1^[6],与 2.1 中估算的结果相符。

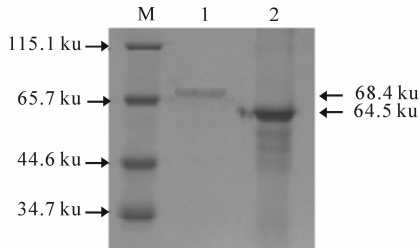


图 2 合成抗原 MPA-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

M. 蛋白质 Marker;1. 合成抗原 MPA-BSA;2. BSA

Fig.2 Identification result of synthesis antigen MPA-BSA by SDS-PAGE

M. Protein molecular weight marker;

1. Artificial antigen MPA-BSA;2. BSA

2.3 MPA-BSA 的 ELISA 检测结果

MPA 检测试剂盒 Medroxyprogesterone Acetate EIA Kit (5131MPA1p[3]08.05)的检测原理是竞争 ELISA,且可以通过对阳性对照 MPA 的定量实现了对检测样品的定量,由于本试验只为了检测 MPA 和 BSA 是否偶联成功及偶联产物的反应原性,故未将测定的吸光值作定量计算。MPA-BSA 的 ELISA 检测结果见表 1。

表 1 人工抗原 MPA-BSA 的 ELISA 检测结果

Table 1 Detection results of synthesis antigen MPA-BSA

项目 Item	对照与检测样品编号 No. of Simples and Controls													
	NC	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
吸光度(OD _{450 nm}) Absorbance	1.644	0.165	0.258	0.614	0.805	1.223	1.444	0.063	0.101	0.139	0.213	0.278	0.456	0.534

从表 1 可以看出,合成抗原样品和阳性对照的 OD_{450 nm} 值均随着 MPA-BSA 稀释度的增加而增大。表明在 MPA 和 BSA 偶联的过程中,没有破坏 MPA 的反应原性。

2.4 MPA-BSA 的动物免疫试验结果

按照 1.3.4 中操作过程,检测人工抗原 MPA-BSA 的免疫原性,MPA 抗体检测结果表明,MPA-BSA 免疫的 C 组和 D 组小鼠均产生较高水平的抗 MPA 抗体。表 2 为 MPA 抗体检测结果(每组提供 1 只小鼠血清抗体的检测结果)。由表 2 可知,A 组小鼠(腹腔注射生理盐水)和 B 组小鼠(免疫 BSA)血清样品的 OD 值均高于阴性对照(NC),为 MPA

抗体阴性;除了由于非特异性吸附引起的稀释度为 1 : 16 000~1 : 20 000 时,C 组小鼠血清样品的 OD 值高于 A 组小鼠外,C 组和 D 组小鼠(免疫 MPA-BSA)血清样品的 OD 值均低于 A 组小鼠和 B 组小鼠;C 组和 D 组小鼠血清样品的 OD 值,在稀释度为 1 : 1~1 : 2 000 时均高于阴性对照 NC,除了 D 组小鼠血清样品 1 : 1 稀释时低于阴性对照 NC。随着进一步稀释(1 : 4 000~1 : 14 000)C 组和 D 组小鼠血清样品的 OD 值均低于阴性对照 NC,表明 C 组和 D 组小鼠血清均为 MPA 抗体阳性血清,但存在非特异性因素影响,随着血清的不断稀释可以减弱非特异性因素对抗原抗体反应结果的干扰,其中

D 组小鼠血清样品中的特异性抗体滴度较高,在 1 : 1 稀释时抗原抗体特异性反应强度超过了非特异性因素的影响,导致其 OD 值低于阴性对照 NC。以低于阴性对照 NC OD 值的最大血清稀释度为抗体效

价,C 组和 D 组小鼠血清中的 MPA 抗体效价分别不低于 1 : 12 000 和 1 : 16 000,进行 2 次重复检测,结果均符合。

表 2 小鼠血清样品 MPA 抗体的检测结果

Table 2 Detection results of antibody against MPA of the mouse serum samples							
样品编号 Sample No	OD 值 OD value						
	1 : 1	1 : 5	1 : 10	1 : 100	1 : 500	1 : 1 000	1 : 2 000
NC	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295
A	1.360	1.400	1.432	1.423	1.416	1.409	1.378
B	1.436	1.466	1.456	1.520	1.484	1.475	1.500
C	1.342	1.377	1.386	1.396	1.412	1.375	1.322
D	0.946	1.343	1.417	1.377	1.368	1.322	1.312

样品编号 Sample No	OD 值 OD value						
	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 12 000	1 : 14 000	1 : 16 000	1 : 18 000	1 : 20 000
NC	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295	1.295
A	1.356	1.364	1.350	1.354	1.347	1.336	1.332
B	1.472	1.460	1.452	1.444	1.436	1.426	1.419
C	1.263	1.250	1.224	1.289	1.364	1.387	1.413
D	1.281	1.249	1.233	1.193	1.273	1.344	1.366

3 讨论与结论

自 Landsteine 首次利用半抗原制备人工抗原以来,人们对农药^[8]、兽药^[9]、饲料添加剂^[10]等很多领域的半抗原物质进行了大量的免疫学研究。目前合成人工抗原的方法有静电偶联和共价偶联 2 种方法,其中以共价偶联法的效果较好,包括混合酸酐法、碳二亚胺法、戊二醛法、重氮化法、氨基氧乙酸化和丁二酸酐衍生法。半抗原与载体偶联一般根据半抗原功能团的不同,选用不同的载体、偶联剂及不同的偶联方法。常用的蛋白质类载体有人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、兔血清白蛋白(RSA)、牛甲状腺球蛋白(TG)和血蓝蛋白(Hemocyanin)等。其中 BSA 由于溶解度大,免疫活性强,又容易获得,而最为常用。MPA 分子结构中没有氨基(-NH₂)或羧基(-COOH),只具有两个酮基(C=O),不能与载体蛋白直接偶联,因此本试验先将 MPA 与盐酸羟胺反应生成 HON=MPA,再与琥珀酸酐反应制得 MPA-HS,最后通过碳二亚胺法将 MPA-HS 偶联到 BSA 载体上。合成抗原的鉴定方法较多,如同位素标记的半抗原示踪法^[11],紫外分光光度法^[5-6],SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,核磁共振^[12]等。为对人工抗原 MPA-BSA 的合成结果进行评价,本试验不仅采用紫外全波长扫描法和 SDS-PAGE 法对合成抗原 MPA-BSA 进行鉴定,而且还采用 ELISA 法和动物免疫试验对合成抗原 MPA-BSA 的反应原性与免疫原性进行评价。

半抗原与载体的偶联比是影响人工抗原免疫原性的重要因素,进而决定着针对半抗原的高特异性、高质量抗体的制备。关于半抗原与载体的偶联比,有学者们认为不同的载体与同种半抗原有不同的最佳偶联比^[13],连接到蛋白质分子 BSA 上的半抗原数以 1~30 为宜。低偶联比的人工抗原可获得高亲和力的抗体,但引起的免疫反应较慢;高偶联比可以增强免疫反应的强度和效价,然而会影响抗体的活性和特异性,并且产生的抗体亲和性较低^[14-15]。本试验采用紫外全波长扫描法和 SDS-PAGE 法,对合成抗原 MPA-BSA 进行鉴定,估算出 MPA 与 BSA 偶联比为 8 : 1,并采用 ELISA 法与动物免疫试验对合成 MPA-BSA 的反应原性与免疫原性进行了检测与鉴定,结果显示,用人工抗原 MPA-BSA 免疫小鼠后 2 份血清中 MPA 抗体的效价分别高达 1 : 12 000 和 1 : 16 000,表明人工抗原 MPA-BSA 的合成成功,并且 MPA 与 BSA 的偶联比为 8 : 1 时,合成抗原 MPA-BSA 具有良好的 MPA 反应原性和免疫原性,从而为 MPA 单克隆抗体的制备奠定了基础;本研究选用的免疫动物是 Balb/c 小鼠,为下一步 MPA 单克隆抗体的研究提供了试验材料和参考依据。

[参考文献]

[1] 高彦生,黄新民. 欧盟激素甲羟孕酮污染事件[J]. 中国畜牧兽医,2002,29(4):31-32.
Gao Y S,Huang X M. The pollution occurrence of medroxyprogesterone acetate in European Union[J]. China Animal Hus-

- bandry &. Veterinary Medicine, 2002, 29(4): 31-32. (in Chinese)
- [2] Jorma K, Ervo V, Ulf-Hkan S, et al. Comparison of mass spectrometry and radio immunoassay to measure medroxyprogesterone acetate in patients with endometrical cancer[J]. European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 1990, 26(9): 975-977.
- [3] Asko J, Petri K, Minna N, et al. Pharmacokinetics of estradiol valerate and medroxyprogesterone acetate in different age groups of postmenopausal women[J]. Maturitas, 2004, 47: 209-217.
- [4] Seong M K, Dong H K. Quantitative determination of medroxyprogesterone acetate in plasma by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001, 15: 2041-2045.
- [5] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays [M]. New York: Elsevier Amsterdam, 1985: 27-28.
- [6] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 279-284.
- Yang L G, Hu S X, Wei P H, et al. Enzyme immunoassays technology[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998: 279-284. (in Chinese)
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆试验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1722.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning A Laboratory Manual[M]. 3rd edited. Beijing: The Science Press, 2002: 1713-1722. (in Chinese)
- [8] 朱国念, 吴银良, 程敬丽. 克百威人工抗原的合成与鉴定[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 28(1): 47-53.
- Zhu G N, Wu Y L, Cheng J L. Synthesis and identification of the antigens for carbofuran[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University: Agric & Life Science Edition, 2002, 28(1): 47-53. (in Chinese)
- [9] 何方洋, 冯才伟, 张 航. 氯霉素全抗原合成及多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(3): 51-53.
- He F X, Feng C W, Zhang H. The synthesis and identification of the antigens for carbofuran the production of its polyclonal antibody chloramphenicol[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(3): 51-53. (in Chinese)
- [10] 许文涛, 黄昆仑, 邓爱科, 等. 莱克多巴胺的抗原合成及其抗体的制备纯化[J]. 食品科学, 2005, 26(12): 29-33.
- Xu W T, Huang K L, Deng A K, et al The synthesis and identification of the antigen of RCT and the production and purification of its polyclonal antibody [J]. Food Science, 2005, 26(12): 29-33. (in Chinese)
- [11] Faraj B A, Ali F M. Development and application of a radioimmunoassay for tetracycline[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1981, 217: 10.
- [12] Lommen A, Haasnoot W, Weseman J M. Nuclear magnetic resonance controlled method for coupling of fenoterol to a carrier and enzyme[J]. Food and Agriculture Immunology, 1995, 7: 123-129.
- [13] 荣康泰, 徐勤惠, 李根令, 等. 半抗原与载体的最佳分子结合比[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1985, 1(2): 27-31.
- Rong K T, Xu Q H, Li G L, et al. Optimum hapten-carrier molecular ratios in artificial antigens[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1985, 1(2): 27-31. (in Chinese)
- [14] Macro M, Gee S, Hammock B D. Immunochemical techniques for environmental analysis. II. Antibody production and immunoassay development[J]. Trends Anal Chem, 1995, 14: 415-425.
- [15] Singh K V, Jasdeep K, Grish C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules[J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15: 168-173.