

DOI:CNKI:61-1390/S.20110810.1103.028

网络出版时间:2011-08-10 11:03:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110810.1103.028.html>

环丙沙星单克隆抗体的制备

贾杰只¹, 陈晓丹², 雷洁¹, 张智英¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 珠海市英平生物科技有限公司, 广东 珠海 519000)

【摘要】【目的】制备环丙沙星(Ciprofloxacin, CPFX)单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 并对其免疫学特性进行鉴定, 为畜产品 CPFX 残留的快速检测提供技术支持。【方法】采用碳二亚胺法(EDC), 将载体蛋白牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)和鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)分别与 CPFX 偶联合成免疫抗原 CPFX-BSA 和包被抗原 CPFX-OVA, 经紫外(UV)扫描和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定后免疫 BALB/c 小鼠, 应用细胞融合技术筛选分泌 CPFX mAb 的杂交瘤细胞株, 采用体内诱生腹水法制备 CPFX mAb, 并对其染色体核型、效价、敏感性和特异性等免疫学特性进行鉴定。【结果】UV 和 SDS-PAGE 鉴定结果表明, 人工抗原偶联成功; 免疫的 5 只小鼠血清抗体效价均达到了 $1:10^5$ 左右, 其中 4 号小鼠血清 CPFX 抑制效价较高且 IC_{50} 最低($17.21 \mu\text{g/L}$), 融合后筛选出 1 株敏感特异的杂交瘤细胞, 命名为 3D2。3D2 细胞培养上清效价为 $1:(1.28 \times 10^3)$, 腹水效价为 $1:(1.6 \times 10^5)$ 。CPFX mAb 对 CPFX 的 IC_{50} 为 $9.95 \mu\text{g/L}$, 对恩诺沙星的交叉反应率为 128.39%, 与其他同系的喹诺酮类抗生素的交叉反应率很低。【结论】获得了高效价、敏感、特异的抗 CPFX mAb, 为 CPFX 残留的快速检测奠定了技术基础。

【关键词】 环丙沙星; 单克隆抗体; ELISA; 杂交瘤

【中图分类号】 S859.84

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)09-0035-06

Preparation of the monoclonal antibody against Ciprofloxacin

JIA Jie-zhi¹, CHEN Xiao-dan², LEI Jie¹, ZHANG Zhi-ying¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Zhuhai Yingping Biotechnology Limited Company, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: 【Objective】The study was conducted to generate monoclonal antibodies against Ciprofloxacin (CPFX) and to identify its immunological traits for the detection of CPFX residue in livestock products. 【Method】The CPFX was conjugated to carrier protein BSA and OVA by EDC to obtain immunogen and coating antigen. The ultraviolet scanning and SDS-PAGE were used to identify CPFX artificial antigen. Then BALB/c mice were immunized with CPFX-BSA. The hybridoma lines that secrete monoclonal antibody against CPFX (CPFX mAb) were established through cell fusion. CPFX mAb was generated by inducing ascites in mice. The immunological characteristics such as Karyotype, titer, sensitivity and specificity of the mAb were characterized. 【Result】The ultraviolet scanning and SDS-PAGE showed that CPFX artificial antigen was synthesized successfully. Five BALB/c mice indirect ELISA titer against CPFX were all above $1:10^5$ and the IC_{50} of No. 4 mice was the lowest ($17.21 \mu\text{g/L}$). One hybridoma cell line of 3D2 was screened for specificity to CPFX after cell fusing. The indirect ELISA titer of the mAb was $1:(1.28 \times 10^3)$ in supernatant, $1:(1.6 \times 10^5)$ in ascites. The mAb of 3D2 showed high sensitivity with an IC_{50} of $9.95 \mu\text{g/L}$, cross reaction rate with enoxacin was 128.39%, cross reaction rate with other quinolone antibiotics was very low. 【Conclusion】Obtained high titer, sensitive, specific anti-CPFX mAb, laid the technical foundation for the rapid detection of CPFX residue.

* [收稿日期] 2011-03-03

[基金项目] 陕西省“13115”科技创新重大专项(2009ZDKG-18)

[作者简介] 贾杰只(1983—), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail: jiajz_2008@163.com

[通信作者] 张智英(1958—), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事动物基因组学、动物病毒学及其在癌症治疗中的应用研究。E-mail: zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

$\mu\text{g/L}$ to CPFX. The rate of cross reaction to Enrofloxacin could reach 128.39%. There were low reactions to other fluoroquinolones antibiotics. 【Conclusion】 The high-titer, sensitive and specific CPFX mAb has been generated, which laid a solid foundation for the detection of CPFX residue.

Key words: Ciprofloxacin; monoclonal antibody; ELISA; hybridoma

环丙沙星(Ciprofloxacin, CPFX)又名悉复欢、丙氟哌酸、适普灵等,为合成的第3代喹诺酮类抗菌药物^[1]。该药物由于具有抗菌谱广、与其他抗菌药无交叉耐药性、临床效果好、不良反应弱等优点,因而在医学和畜禽疾病防治中被广泛应用,是当前世界上最佳的抗感染药物之一^[2]。但是环丙沙星的半衰期较长,易在动物体内残留,可引起人类不良反应和细菌耐药性的发生。环丙沙星的大量使用导致其在动物性食品中的残留问题日益突出,已经严重地危及到我国动物性食品的外贸出口和人类的身体健康^[3]。因此,对动物组织及动物性食品中环丙沙星残留的检测就显得尤为重要。

目前用于抗生素药物残留检测的主要方法有高效液相色谱(HPLC)法和酶联免疫吸附法(ELISA)等^[4-5]。ELISA因具有快速、灵敏、简便、价廉等优势,已成为目前兽药残留检测的常用方法,而制备高效、特异、敏感的单克隆抗体,是ELISA检测技术的关键。本研究旨在制备出高效价、敏感、特异的环丙沙星单克隆抗体,为环丙沙星残留的快速检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂 CPFX,纯度 $\geq 99.0\%$,Sigma产品;恩诺沙星、左氧氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、盐酸沙拉沙星标准品,均购自中国兽医药品监察所;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵白蛋白(OVA),陕西杨凌宝鑫公司产品;弗氏完全佐剂(CFA)、弗氏不完全佐剂(IFA),西安沃尔森公司产品;碳二亚胺盐酸盐(EDC),细胞培养基 RPMI-1640、PEG-4000, Sigma 公司产品;HAT、HT, Gibco 公司产品;新生牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司产品;羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP),武汉博士德公司产品;其他试剂市售所得,AR级。

1.1.2 仪器 550型酶标仪,美国Bio-Rad公司;凝胶成像系统及分析软件, Syngene 公司;二氧化碳培养箱,美国Thermo公司;荧光倒置显微镜, Motic 公司;低速离心机,美国Thermo公司;磁力搅拌器,常州国华电器有限公司。

1.2 试验动物和细胞

6~8周龄、体质量为13~16 g的雌性BALB/c小鼠,购自第四军医大学。

骨髓瘤细胞 SP2/0,由陕西省农业分子生物学重点实验室保存。

1.3 人工抗原 CPFX-BSA 的合成与鉴定

1.3.1 人工抗原的合成 参照文献^[6]的方法,采用碳二亚胺法将环丙沙星3位上的羧基分别与BSA和OVA上游离的氨基偶联,合成人工免疫抗原CPFX-BSA和包被抗原CPFX-OVA。将合成的人工抗原在200~400 nm紫外波长下扫描,检测偶联情况。

1.3.2 人工抗原的鉴定 1)UV鉴定。用PBS配制CPFX和BSA标准溶液,取一定量的CPFX-BSA溶于PBS,用Bradford法测定其蛋白质的质量浓度,据此质量浓度调节CPFX-BSA溶液中BSA的质量浓度与BSA标准溶液一致,在波长200~400 nm内进行紫外扫描,根据吸收波峰情况判断偶联是否成功^[7]。

2)SDS-PAG鉴定。按照郭尧君^[8]的方法并稍作调整进行试验。选择50 g/L浓缩胶、120 g/L分离胶,浓缩胶电压120 V,分离胶电压100 V,用考马斯亮蓝染色4~5 h后,置脱色液中脱色过夜。

1.4 单克隆抗体的制备

1.4.1 动物免疫 取与所用骨髓瘤细胞SP2/0同源的6~8周龄雌性BALB/c小鼠5只,用抗原CPFX-BSA免疫小鼠(0.3 mL/只),剂量为100 μg /只。首免用无菌PBS稀释CPFX-BSA,与等量CFA混合乳化,四肢内侧及腹腔分点皮下注射;加强免疫用无菌PBS稀释CPFX-BSA,与等量IFA混合乳化,每次间隔2周,共免疫5次。

1.4.2 细胞融合小鼠的选择 最后一次免疫后1周断尾采血,分离血清,用间接ELISA方法检测多克隆抗体血清的抗体效价^[9],阻断ELISA法检测其抑制效价^[10],选择效价高且抑制效价最低的小鼠用于细胞融合。

1.4.3 细胞融合 细胞融合前3 d,用RPMI-1640完全培养基复苏培养SP2/0骨髓瘤细胞。最后一次免疫后4 d,摘除小鼠眼球,眶下窦采血分离阳性血清并将小鼠脱颈致死,放于体积分数70%酒精中

浸泡消毒 10 min,无菌操作取出脾脏,制备脾细胞悬液。将准备好的骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞按一定比例(1:5 或 1:10)混合,在体积分数 50%聚乙二醇的作用下,各种淋巴细胞可与骨髓瘤细胞发生融合,将混合后的细胞悬液接种到 96 孔细胞培养板中,加入 HAT 选择培养基后,置于 37℃、体积分数 5%的 CO₂ 培养箱中培养。

1.4.4 融合细胞的培养及阳性杂交瘤的筛选与克隆 融合细胞共需培养 14 d,分别于第 4,9,12 天用 HT 培养基半量换液,之后逐渐改用 RPMI-1640 完全培养基培养。吸取细胞上清用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选阳性杂交瘤细胞株,选择强阳性、抑制效果好、生长旺盛的细胞孔制备细胞悬液,转至 24 孔细胞培养板中扩大培养,5 d 左右吸取上清再次筛选。对筛选出来的孔采用有限稀释法进行克隆,通过细胞计数,保证每个孔中大约 1 个细胞,采用 RP-MI-1640 完全培养基培养,采用上述方法进行新一轮的筛选。经过多次筛选和克隆,最后转至细胞培养皿中,通过对细胞培养上清的进一步检测和筛选,确定能够分泌 CPF_X mAb 的杂交瘤细胞株。

1.4.5 CPF_X mAb 的生产 采用体内诱生腹水法生产 mAb^[11]。向 BALB/c 小鼠腹腔注入灭菌液体石蜡 0.5 mL/只,7 d 后注入阳性细胞 10⁷/只,7~10 d 后可见小鼠腹部胀大,多濒于死亡,用针头将腹水吸入试管中,一只小鼠可获得 1~10 mL 腹水,用饱和硫酸铵盐析法纯化 mAb。

1.5 CPF_X mAb 免疫学特性的鉴定

1.5.1 杂交瘤细胞核型分析 采用秋水仙素裂解法检测杂交瘤细胞染色体的平均数目。

1.5.2 效价测定 采用间接 ELISA 法测定细胞培养上清和小鼠腹水中 CPF_X mAb 的效价。

1.5.3 敏感性测定 采用阻断 ELISA 法测定 mAb 对不同质量浓度 CPF_X 的抑制率。试验具体操作参照张海棠^[12]的方法并作一定的调整。用

CPF_X-OVA(5 μg/mL)包被酶标板,100 μL/孔,4℃过夜包被;倒去包被液,拍干后加入含有体积分数 5%脱脂乳的封闭液 200 μL/孔,37℃孵育 2 h;弃掉封闭液并用 PBST 洗板 3 次;然后加入 50 μL 抗体(1:1 000 倍稀释),再加入等体积的不同质量浓度(640,320,160,80,40,20,10,5 ng/mL)的 CPF_X 标准液,同时设置阴性和空白对照。37℃孵育 1 h;加入工作浓度的酶标二抗(1:10 000 倍稀释),37℃孵育 1 h;每孔加入 100 μL TMB 显色液,室温反应 10 min;每孔加入 50 μL 终止液终止反应,用酶标仪读 OD₄₅₀ 值,按下式计算 CPF_X 的抑制率:

CPF_X 的抑制率 = 试验组 OD₄₅₀/对照组 OD₄₅₀ × 100%。

以不同质量浓度 CPF_X 的常用对数值为横坐标,以抑制率为纵坐标,绘制标准的抑制曲线,进行相关回归分析,计算 mAb 对 CPF_X 的半数抑制质量浓度 IC₅₀。

1.5.4 特异性测定 单克隆抗体的特异性用交叉反应率来反映,用 CPF_X 及其同系的喹诺酮类药物作为抑制剂,以阻断 ELISA 法分别测定恩诺沙星、沙拉沙星、氧氟沙星等的标准曲线和 IC₅₀ 值。以 mAb 对 CPF_X 的 IC₅₀ 与各抑制物的 IC₅₀ 之比的百分数为其交叉反应率^[13]。

2 结果与分析

2.1 人工抗原 CPF_X-BSA 的鉴定

分别对偶联物、半抗原、载体蛋白的溶液进行紫外分光光度计扫描,结果见图 1。由图 1 可知,BSA 的最大吸收峰在 260 nm 处,CPF_X 的最大吸收峰在 269 nm 处,两者偶联后,CPF_X-BSA 的最大吸收峰叠加并前移至 265 nm 处,表明人工抗原偶联成功。SDS-PAGE 鉴定结果见图 2。图 2 表明,CPF_X-BSA 的泳动速度小于 BSA,说明 CPF_X-BSA 的分子质量大于 BSA,证明偶联成功。

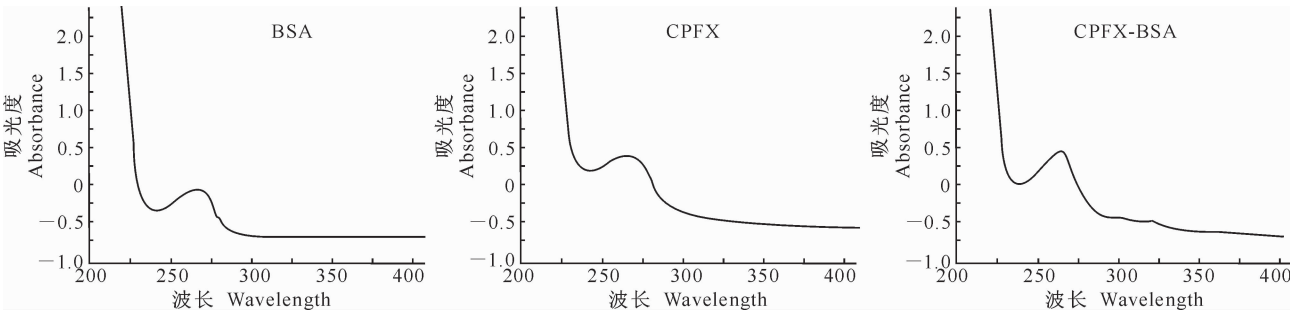


图 1 人工抗原 CPF_X-BSA 的紫外扫描鉴定
Fig. 1 Results of the ultraviolet scanning

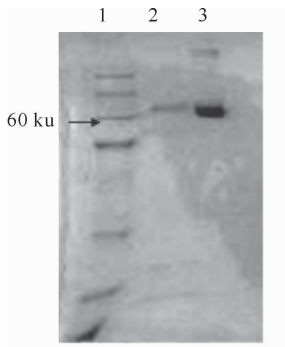


图 2 人工抗原 CPFX-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定
1. Marker;2. CPFX-BSA;3. BSA
Fig. 2 Identification of CPFX-BSA conjugation by SDS-PAGE

2.2 小鼠多克隆抗体效价及 IC₅₀ 的测定

小鼠多克隆抗体间接 ELISA 效价测定结果见表 1。由表 1 可知,免疫的 5 只小鼠多克隆抗体血清效价均达到了 1 : 10⁵ 左右,免疫效果较好。小鼠 CPFX 多克隆抗体对 CPFX 的抑制曲线见图 3。由图 3 可见,5 只小鼠的多克隆抗体血清对 CPFX 均有抑制作用,其标准曲线回归方程分别为: $y = -29.436x + 84.344, R^2 = 0.9536$; $y = -28.687x + 86.362, R^2 = 0.9743$; $y = -34.108x + 96.069, R^2 = 0.9217$; $y = -31.222x + 88.594, R^2 = 0.9813$; $y = -33.183x + 91.078, R^2 = 0.941$ 。根据标准曲线回归方程计算半数抑制质量浓度 IC₅₀。经计算,4 号小鼠的 IC₅₀ 最低,为 17.21 μg/L,因此,选择血清效价最高且 IC₅₀ 最低的 4 号小鼠作细胞融合。

表 1 CPFX pAb 的间接 ELISA 效价
Table 1 Measurement titer of CPFX pAb by indirect ELISA

小鼠 序号 No.	多抗稀释倍数 Diluted multiple of pAb								阴性 NC	空白 BC
	1 : (1×10 ³)	1 : (2×10 ³)	1 : (4×10 ³)	1 : (8×10 ³)	1 : (1.6×10 ⁴)	1 : (3.2×10 ⁴)	1 : (6.4×10 ⁴)	1 : (1.28×10 ⁵)		
1	1.868	1.784	1.676	1.418	1.233	0.775	0.504	0.388	0.175	0.058
2	1.893	1.749	1.670	1.441	1.244	0.853	0.621	0.396	0.170	0.069
3	1.864	1.701	1.519	1.244	0.906	0.671	0.411	0.368	0.180	0.079
4	2.094	1.987	1.893	1.778	1.599	1.474	1.236	0.954	0.169	0.068
5	1.917	1.580	1.397	1.135	0.829	0.572	0.393	0.389	0.181	0.089

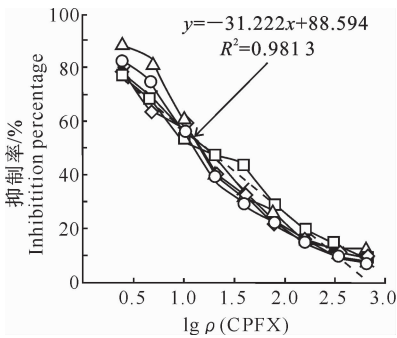


图 3 CPFX 多克隆抗体对 CPFX 的抑制曲线
—◇—, 1 号小鼠; —□—, 2 号小鼠; —△—, 3 号小鼠;
—×—, 4 号小鼠; —○—, 5 号小鼠; ---, Linear(4 号小鼠)

Fig. 3 Inhibitory curves of CPFX pAb against CPFX by blocking ELISA

—◇—, No. 1 mouse; —□—, No. 2 mouse; —△—, No. 3 mouse;
—×—, No. 4 mouse; —○—, No. 5 mouse; ---, Liner(No. 4 mouse)

2.3 融合细胞的培养及阳性杂交瘤细胞的筛选

细胞融合后 6~7 d 可见克隆长出,计数后计算出本试验融合率为 83%,阳性率为 12%,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 进行筛选,选取效价高、抑制效果最好的 2 个孔进行亚克隆,经过 3 次有限稀释克隆化,最终筛选到 1 株能稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株,命名为 3D2。经多次传代、冻存

和复苏后检测,杂交瘤细胞株分泌抗体效价稳定。

2.4 CPFX mAb 免疫学特性的鉴定

2.4.1 杂交瘤细胞的染色体核型分析 SP2/0 细胞染色体为 68 条,脾细胞染色体为 40 条,杂交瘤细胞株 3D2 染色体平均为 96 条(图 4),多于 2 个亲本的染色体,符合杂交瘤细胞的特征,说明 3D2 的确是脾细胞与 SP2/0 细胞融合产生的,但是伴有染色体丢失的现象且多为近端着丝粒染色体。

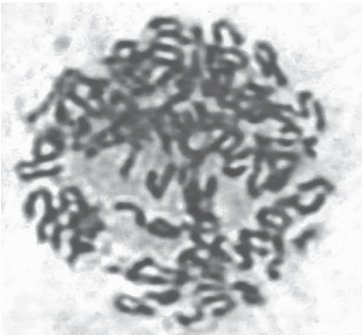


图 4 杂交瘤细胞 3D2 的染色体众数(400×)

Fig. 4 Quantity of chromosome of hybridoma(400×)

2.4.2 效价测定 杂交瘤细胞 3D2 分泌的 mAb 具有较高的效价,细胞培养上清和腹水中的效价分别达到了 1 : (1.28×10³) 和 1 : (1.6×10⁵)。

2.4.3 敏感性测定 如图 5 所示,3D2 mAb 标准抑制曲线的线性回归方程为 $y = -32.733x + 82.657 (R^2 = 0.9828)$,根据回归方程计算出 3D2 mAb 对 CPFX 的 IC_{50} 为 $9.95 \mu g/L$,表明 CPFX mAb 对 CPFX 具有较高的敏感性。

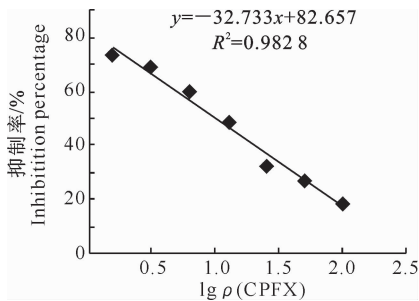


图 5 CPFX mAb 对 CPFX 敏感性的检测

Fig. 5 Test of sensitivity the CPFX mAb against CPFX

2.4.4 特异性测定 3D2 腹水单抗特异性测定结果见表 2。由表 2 可知,CPFX mAb 对 CPFX 的 IC_{50} 为 $9.95 \mu g/L$,说明 CPFX 与其 mAb 是特异性结合的。由于 CPFX 是恩诺沙星的活性代谢产物^[14],两者结构非常接近,所以产生的 mAb 对恩诺沙星有较强的交叉反应,但与其他同系的喹诺酮类抗生素的交叉反应很低,证明获得的单抗对 CPFX 有很强的特异性。

表 2 CPFX mAb 与喹诺酮类抗生素的交叉反应率

Table 2 Cross reactivity of ciprofloxacin McAb for fluoroquinolones antibiotics		
氟喹诺酮类抗生素 Fluoroquinolones	$IC_{50} / (\mu g \cdot L^{-1})$	交叉反应率/% Consensual reaction
盐酸环丙沙星 Ciprofloxacin mhydrochloride	9.95	100
诺氟沙星 Norfloxacin	319	3.12
恩诺沙星 Enrofloxacin	7.75	128.39
沙拉沙星 Sarafloxacin	147	6.77
左氧氟沙 Levofloxacin	1 805	0.55
甲磺酸培氟沙星 Pefloxacin mesylate	305	3.26
氧氟沙星 Ofloxacin	236	4.22

3 讨论

3.1 人工抗原的合成

CPFX 的分子式为 $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl$,相对分子质量为 367.80,属于小分子半抗原,本身不具有免疫原性,必须与载体蛋白偶联成人工完全抗原,才能获得免疫原性。根据 Landsteiner 创立的小分子半抗原理论,半抗原在设计时应遵循 3 条原则:不产生新的抗原决定簇;化学反应简单易行;间接臂

性质稳定且长度适宜。根据 CPFX 的化学结构,在人工完全抗原合成时,本试验采用 EDC 法,将 CPFX 3 位上的羧基官能团与载体蛋白 BSA 和 OVA 上游离的氨基偶联,合成了人工完全抗原。本试验之所以采用 EDC 法合成完全抗原,是因为采用 EDC 法能保证产生的连接桥长度为零,这样能有效地避免桥抗体的产生,确保了抗体生产的特异性。本试验通过紫外扫描及 SDS-PAGE 检测证明,CPFX-BSA 免疫抗原制备成功。后期免疫制备所得的 mAb 检测结果也证明了所得抗原的正确性。

3.2 阳性细胞的筛选

将致敏 B 淋巴细胞与有代谢缺陷的骨髓瘤细胞进行细胞融合时,这种融合是随机的,除骨髓瘤细胞和脾细胞融合外,还有骨髓瘤细胞之间的融合和脾细胞之间的融合,以及一些未融合的细胞。其中骨髓瘤细胞与脾细胞融合后,形成杂交瘤细胞。在这些细胞中,只有杂交瘤细胞能够在特殊 HAT 培养基中存活,从而将杂交瘤细胞分离出来。而培养基中生长的杂交瘤细胞,只有少数是分泌预定特异性单克隆抗体的细胞。因此,必须对阳性孔进行筛选。阳性杂交瘤细胞的筛选时间是非常关键的,筛选得过早,抗体分泌量及质量浓度较低,容易漏掉阳性杂交瘤细胞;筛选得过晚,杂交瘤细胞生长过度,可能会引起阳性杂交瘤细胞的死亡。本试验对筛选时间进行摸索后发现,筛选在融合后第 12 天进行为宜。筛选方法一般以快速、简便、敏感为原则,本试验采用间接 ELISA 方法,应用 CPFX-OVA 包被酶标板,对长出单细胞克隆的孔进行检测,吸取细胞培养上清,这样能够尽可能地保证所得阳性结果是与 CPFX 特异性结合的抗体,而非 BSA 所产生的抗体。另外,本试验应用 24 孔板对筛选所得的阳性克隆进行扩增,可以避免由于克隆数较少、细胞生长不旺盛等原因造成的阳性克隆的丢失,同时仅对有阳性反应的孔进行亚克隆,在操作时间及工作量上较之前的传统方法要节省很多。最终结果表明,应用该操作可快速得到特异性较好的阳性细胞株。

本试验通过细胞融合技术成功获得了 1 株高效价、敏感、特异的分泌特定抗体的杂交瘤细胞株,经多次传代、冻存与复苏,杂交瘤细胞分泌抗体稳定,CPFX mAb 的成功制备为免疫学检测环丙沙星药物残留及相关产品的开发奠定了技术基础。

[参考文献]

[1] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科学

- 技术出版社,2002:258-261.
- Li J S, Qiu Y M, Wang C. Veterinary drug residue analysis [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 258-261. (in Chinese)
- [2] 李继昌, 曾成武, 符春燕, 等. 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.
- Li J C, Ceng C W, Fu C Y, et al. Applications of Fluoroquinolones drugs in poultry disease prevention [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 1998(10): 27. (in Chinese)
- [3] 胡 鲲, 杨先乐, 唐 俊, 等. 绒螯蟹中 3 种氟喹诺酮类药物残留检测的前处理方法研究 [J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(5): 670-675.
- Hu K, Yang X L, Tang J, et al. Effects of sample pretreatment on three kinds of Quinolones residues determination in fishery products by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2007, 26(5): 670-675. (in Chinese)
- [4] Aposyniak, Jzmudzk, Issemeniuk, et al. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 1999, 13(4): 279-285.
- [5] Silverlight J, Coldham N, Thorne L, et al. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products [J]. Food Add it Contam, 2003, 20(3): 221-228.
- [6] Zhou Y, Li Y S, Wang Z, et al. Synthesis and identification of the antigens for ciprofloxacin [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2006, 26(2): 200-203.
- [7] 职爱民, 刘庆堂, 李青梅, 等. 环丙沙星单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(18): 12-16.
- Zhi A M, Liu Q T, Li Q M, et al. Generation and immunological traits of monoclonal antibody for Ciprofloxacin [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(18): 12-16. (in Chinese)
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 70-73.
- Guo Y J. Protein electrophoresis experiment technology [M]. Beijing: Science Press, 2001: 70-73. (in Chinese)
- [9] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985: 173-210.
- [10] Shelvet W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the beta-adrenergic agonist ractopamine [J]. J Immunoassay, 2000, 21(1): 1-23.
- [11] Qing L, Wu J, Qi Y, et al. Production of monoclonal antibodies to broad bean wilt virus and application in virus detection [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(2): 166-173.
- [12] 张海荣, 王自良, 邓瑞光, 等. 莱克多巴胺单克隆抗体的研制及阻断 ELISA 检测方法的建立 [J]. 核农学报, 2008, 22(6): 904-908.
- Zhang H T, Wang Z L, Deng R G, et al. Generation of monoclonal antibody and development of blocking ELISA kit for Ractopamine [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2008, 22(6): 904-908. (in Chinese)
- [13] Shelver W L, Smith D J. Development of an immunoassay for the β -Adrenergic Agonist Ractopamine [J]. Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 2000, 21(1): 1-23.
- [14] Fu L X, Jiang Z G, Ding H Z, et al. Population pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in ill cows [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2008, 31(3): 240-245.

欢迎订阅 2012 年《分子植物育种》

《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志,也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于 2003 年创刊,创刊伊始即被美国化学文摘(CA)、中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库、中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。

本刊设置固定栏目和随机栏目。固定栏目常设研究论文(An Article)和研究报告(A Letter),主要发表最新的原始研究成果。随机栏目根据稿源可能设研究评述(A Review)、研究资源(A Resource)、数据分析(Analysis)、技术主题(Technology Feature)等栏目,还可能设置刊登有关科学新闻、科学简讯、专利、短评、书评等方面的栏目。本刊在栏目设置和文体格式上参照国际著名周刊《自然》及《自然遗传学》的刊发形式。主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等方面。《分子植物育种》已经成为植物育种及相关研究领域研究成果发表和交流的最重要学术平台,代表了目前中国分子植物育种的现实情况,是了解中国分子植物育种的一个重要窗口。

欢迎订阅《分子植物育种》,双月刊,单月 28 日出版,国内定价:¥40.00 元/期,¥240.00 元/年;国际定价:\$40.00 元/期,\$240.00 元/年。国内统一刊号:CN46-1068/S,国际标准刊号:ISSN 1672-416X,邮发代号:84-23。订户可到当地邮局订阅,或直接汇款至编辑部,免收邮费。

地 址:海南省海口市海秀大道 128 号双岛公寓 13B 室,邮 编:570206

联系电话:0898-68966415;传 真:0898-68958180

E-mail:mpb@sophiapublisher.com;在线投稿:http://chinese.sophiapublisher.com