

网络出版时间:2021-05-17 11:27 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.11.007
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210517.1035.005.html

巴氯芬人工抗原的合成及其鼠源多克隆抗体的制备

王 耀¹,曹金博^{2,3},胡晓飞²,段张秀⁴,庞杏豪^{1,2},
孟继秋^{1,2},孙亚宁²,曹夕丹¹,陈秀金¹,李兆周¹

(1 河南科技大学 食品与生物工程学院,河南 洛阳 471023;2 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002;
3 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;4 新乡市动物卫生监督所,河南 新乡 453003)

[摘 要] 【目的】合成巴氯芬(baclofen,BA)人工抗原并制备其多克隆抗体,为巴氯芬免疫学快速检测方法的建立奠定基础。【方法】采用碳二亚胺(EDC)法将 BA 分别与牛血清白蛋白(BSA)和鸡卵清白蛋白(OVA)偶联,合成免疫抗原 BA-BSA 和包被抗原 BA-OVA,通过紫外扫描和 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定其偶联效果。将免疫抗原 BA-BSA 免疫 BALB/c 小鼠,利用间接 ELISA、间接竞争 ELISA 及交叉反应试验分别对所获多克隆抗体的效价、敏感性、特异性等免疫学特性进行鉴定。【结果】紫外扫描和 SDS-PAGE 凝胶电泳结果表明人工抗原偶联效果良好。ELISA 结果表明,多克隆抗体的效价达到 1:256 00,半数抑制浓度(IC₅₀)为 22.33 ng/mL,且与巴氯芬结构类似物及其他瘦肉精类药物(γ-氨基丁酸、氯丙那林、可乐定、赛庚啶、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺)交叉反应率均小于 0.3%,具有良好的敏感性和特异性。【结论】成功合成了巴氯芬人工抗原,并制备了免疫学特性良好的巴氯芬鼠源多克隆抗体。

[关键词] 巴氯芬;人工抗原;多克隆抗体;ELISA

[中图分类号] S852.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2021)11-0046-07

Synthesis of baclofen artificial antigen and preparation of murine polyclonal antibody

WANG Yao¹,CAO Jinbo^{2,3},HU Xiaofei²,DUAN Zhangxiu⁴,PANG Xinghao^{1,2},
MENG Jiqu^{1,2},SUN Yaning²,CAO Xidan¹,CHEN Xiujin¹,LI Zhaozhou¹

(1 College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China;
2 Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China;
3 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
4 Xinxiang Animal Health Supervision Institute, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: 【Objective】This study synthesized artificial antigen of baclofen (BA) and obtained murine polyclonal antibody with good immunological characteristics to provide an effective antibody for the research of rapid immunology detection method of baclofen. 【Method】In this study, baclofen was conjugated with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by EDC method to synthesize immune antigen BA-BSA and coated antigen BA-OVA. The conjugation effect of artificial antigen was identified by UV scanning and SDS-PAGE. BLAB/c mice were immunized with immune antigen to obtain polyclonal antibody. The immunological characteristics (titer, sensitivity and specificity) of obtained polyclonal antibody were

[收稿日期] 2020-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31702218);河南省科技攻关项目(182102110445);河南省自然科学基金项目(182300410038);河南省青年人才托举工程项目(2020HYTP029);河南省动物免疫学重点实验室开放课题(PKLAI20170603);河南省农业科学院科研发展专项资金项目(2019CY04);国家级大学生创新创业训练计划项目(202010464024)

[作者简介] 王 耀(1986—),男,河南三门峡人,副教授,博士,主要从事食品安全检测研究。E-mail:wangyao@haust.edu.cn

[通信作者] 李兆周(1982—),男,河南安阳人,副教授,博士,主要从事食品安全检测研究。E-mail:ilizhaozhou@126.com

identified by indirect ELISA, indirect competitive ELISA and cross reaction test. 【Result】 UV scanning and SDS-PAGE results showed that the conjugation effect of artificial antigen was good. ELISA results showed that polyclonal antibody titer reached 1 : 256 00, and half-inhibitory concentration (IC_{50}) was 22.33 ng/mL. The cross reactivity with structural analogues and other lean meat powder drugs (γ -aminobutyric acid, clorprenaline, clonidine, cyproheptadine, clenbuterol, salbutamol and ractopamine) were all less than 0.3%, showing good sensitivity and specificity. 【Conclusion】 This study successfully synthesized baclofen artificial antigens and prepared polyclonal antibody with good immunological characteristics.

Key words: baclofen; artificial antigen; polyclonal antibody; ELISA

巴氯芬(baclofen, BA)又名氯苯氨基丁酸,化学名为 4-氨基-3-对氯苯基丁酸,是 γ -氨基丁酸的一种衍生物,其化学结构式如图 1 所示。巴氯芬属于镇静剂类药物,可抑制单突触和多突触反射在中枢神经系统的传递,临床上多用于治疗中枢性痉挛性瘫痪、缓解肌张力障碍等^[1-3]。将巴氯芬添加至饲料中,可抗热应激,增加采食量,促进畜禽生长、提高瘦肉率^[4-5]。近年来在饲料安全监测工作中,发现有将巴氯芬作为传统瘦肉精替代物使用的情况^[6-7]。但巴氯芬并非兽药或饲料添加剂,其在禽畜养殖过程中的非法使用,将导致动物性食品安全问题,危害人体健康,造成嗜睡、呕吐、眩晕、腹泻等症状,严重时可导致类似脑死亡的症状^[8-10]。因此,建立针对巴氯芬的高效快速检测方法对于强化饲料安全监测、保障动物性食品安全具有重要的意义。

目前,巴氯芬的检测方法主要有毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[11]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS)^[13]等。原农业部 1862 号和 2349 号公告发布的国家标准以及湖南省发布的地方标准(DB43/T 889—2014)中所规定的饲料中巴氯芬检测方法均采用了 HPLC 和 LC-MS,此类检测方法准确度和灵敏度高,但检测仪器昂贵、样品前处理复杂、检测过程繁琐,局限于实验室精准检测,不适合批量样品快速筛查。相比之下,免疫分析技术利用抗体对抗原进行特异性识别,具有灵敏快速的优势,其中酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫层析检测(immunochromatographic assay, ICA)等方法在兽药残留、动物疫病筛查方面应用广泛^[14-16],但目前仍缺乏针对巴氯芬的免疫学快速检测方法。本试验合成巴氯芬人工抗原,用其免疫 BLAB/c 小鼠,制备巴氯芬鼠源多克隆抗体,并对其免疫学特性进行鉴定,旨在为巴氯芬免疫学快

速检测方法的建立奠定基础。

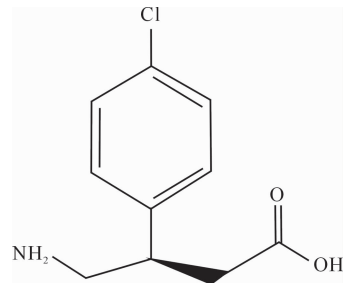


图 1 巴氯芬化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of baclofen

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 巴氯芬、 γ -氨基丁酸、氯丙那林、可乐定、赛庚啶、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺等标准品、1-(3-甲氨基丙基)-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),均购自美国 Sigma 公司;羊抗鼠酶标二抗(GaMIGG-HRP),购自美国 Abbkine 公司; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、 KH_2PO_4 、NaCl、KCl 和 $NaHCO_3$ 等常用分析纯级试剂,购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器 BSA224S 型电子天平(德国 Sartorius 公司),Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司),Vortex 2 型振荡器、T8.10 高速均质乳化机(艾卡仪器设备有限公司),SZCL-2 型控温磁力搅拌器(巩义予华仪器有限公司),HPX-9052MBE 型恒温培养箱(上海博迅实业有限公司)。

1.1.3 试验动物 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,购自河南省实验动物中心。

1.2 巴氯芬人工抗原的合成

采用 EDC 法^[17]合成巴氯芬人工抗原,其合成路线如图 2 所示。称取 5 mg 巴氯芬溶于 1 mL 双

蒸水中(用 1 mol/mL 的 HCl 调 pH 值为 4.0 左右),加入 5.4 mg NHS 和 9.0 mg EDC,室温避光反应 30 min。称取 7.8 mg BSA 溶于 1 mL 的 PBS 缓冲液中,将上述巴氯芬溶液缓慢滴加其中,室温避光反应 5 h。最后,将反应液转移至洁净透析袋中,4

℃条件下用 PBS 缓冲液搅拌透析 3 d,每天换液 3 次。透析结束后,5 000 r/min 离心 5 min 去除沉淀得到巴氯芬免疫抗原(BA-BSA)。采取同样的方法制备巴氯芬包被抗原(BA-OVA)。

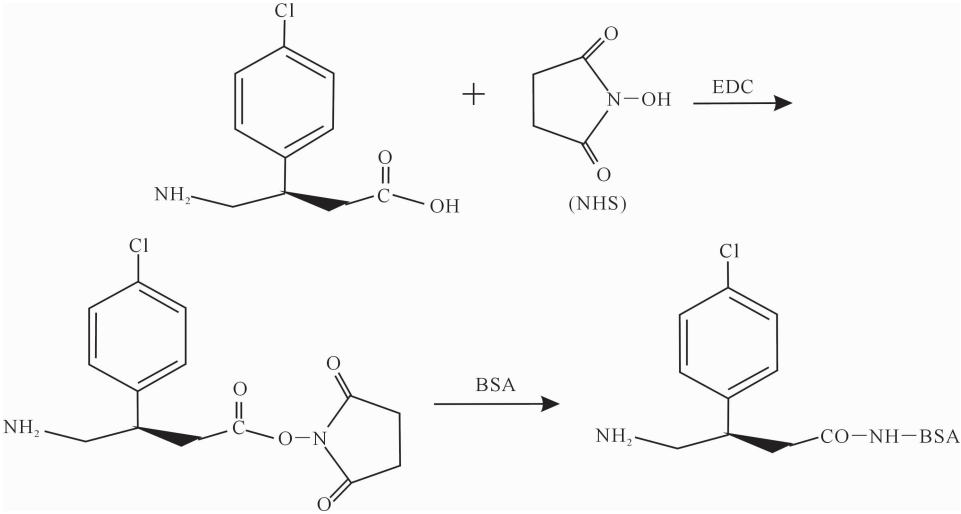


图 2 巴氯芬免疫抗原(BA-BSA)的合成路线

Fig. 2 Synthetic route of baclofen immunogen (BA-BSA)

1.3 BA-BSA 的鉴定

1.3.1 紫外扫描鉴定 用 PBS 缓冲液配制与 BA-BSA 质量浓度(2.1 mg/mL)一致的巴氯芬标准品溶液(BA)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 BA-BSA、BA、BSA 进行扫描,并根据各溶液特征峰的变化判断巴氯芬与 BSA 的偶联效果。BA-OVA 紫外扫描鉴定方法同 BA-BSA。

1.3.2 SDS-PAGE 鉴定 参照文献[18]配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,备用。将 10 μL BA-BSA、BSA 液(BA-BSA、BSA 含量均为 5 μg)加入上样孔中进行电泳,电泳时浓缩胶层电压调至 60 V,分离胶层电压调至 90 V。凝胶电泳结束后用考马斯亮蓝染色液对分离胶染色 2 h,然后用乙酸脱色液脱色 6 h,通过凝胶成像系统拍照,对比 BSA 与 BA-BSA 电泳条带的位置差异,判断 BA 与 BSA 的偶联效果。

1.4 巴氯芬多克隆抗体的制备

选择 4 只健康的 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,将 BA-BSA 采用背部多点皮下注射方式免疫小鼠 4 次,每次间隔 3 周,注射量为 200 μL,免疫剂量为 30 μg/只。首次免疫用灭菌的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释 BA-BSA,并与等体积的 FCA 混合,充分乳化后注射小鼠。后 3 次免疫为加

强免疫,操作与首次免疫基本相同,仅需将 FCA 换为 FIA。免疫完成后 30 d 断尾采血,用 PBS 稀释后 5 000 r/min 离心 5 min,取上清用于多克隆抗体的免疫学特性鉴定。

1.5 巴氯芬多克隆抗体的效价测定

用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CBS)将巴氯芬包被抗原 BA-OVA 稀释为 2 μg/mL,加入 96 孔 ELISA 板,每孔 50 μL,4 ℃包被过夜;用含体积分数 0.05% Tween 20 的 PBS(PBST)洗板后,每孔加入 100 μL 含 50 g/L 脱脂奶粉的封闭液 PBST,37 ℃封闭 1 h 后洗板晾干备用。

取已包被 BA-OVA 的 ELISA 板,采用间接 ELISA 法测定巴氯芬多克隆抗体效价^[19]。首先加入倍比稀释(1:200,1:400,1:800,1:1 600,1:3 200,1:6 400,1:12 800,1:25 600)的多克隆抗体(50 μL/孔)于 ELISA 板孔中,并设置空白对照孔(加入 PBS 50 μL),37 ℃孵育 15 min 后洗板;然后取 GaMIgG-HRP,用封闭液稀释 5 000 倍,加入 ELISA 板(50 μL/孔),37 ℃孵育 30 min 后洗板;最后加入 TMB 显色液(50 μL/孔)显色 10 min 后,加入终止液(2 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液)50 μL/孔,用酶标仪在 450 nm 处测各孔的吸光值(OD₄₅₀)。判定效价的试验孔 OD₄₅₀ 值应大于等于空白对照孔 OD₄₅₀ 值的 2.1 倍。

1.6 巴氯芬多克隆抗体的敏感性鉴定

采用间接竞争 ELISA 鉴定巴氯芬多克隆抗体的敏感性^[20]。取已包被 BA-OVA 的 ELISA 板,加入不同质量浓度(500,250,125,62.5,31.25,15.63,7.81,3.91,1.95 和 0 ng/mL)的巴氯芬标准溶液 50 μ L/孔,再加入效价测定时 OD_{450} 值为 1.0 左右所对应稀释度的多克隆抗体 50 μ L/孔,并设置空白对照孔(加入 PBS 50 μ L,不加多克隆抗体),37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后洗板,其余操作步骤与多克隆抗体效价测定试验相同。测定不同质量浓度 BA 标准溶液孔的 OD_{450} 值(B)以及 0 ng/mL 标准溶液孔的 OD_{450} 值(B_0),以 BA 标准溶液质量浓度的常用对数值为横坐标、 B/B_0 为纵坐标,绘制抑制曲线,求线性回归方程。通过线性回归方程计算半数抑制浓度(IC_{50}),即 B/B_0 为 0.5 时所对应的标准溶液质量浓度, IC_{50} 值越低,则多克隆抗体敏感性越强。

1.7 巴氯芬多克隆抗体的特异性鉴定

通过交叉反应试验鉴定多克隆抗体特异性^[21]。选择 γ -氨基丁酸以及氯丙那林、可乐定、赛庚啶等

瘦肉精类药物作为竞争物,通过间接竞争 ELISA 测定各竞争物对多克隆抗体的 IC_{50} ,将巴氯芬的 IC_{50} 与竞争物的 IC_{50} 百分比作为交叉反应率(cross reactivity,CR),衡量多克隆抗体特异性。

2 结果与分析

2.1 BA-BSA 的鉴定

2.1.1 紫外扫描结果 人工抗原紫外扫描结果如图 3 所示。由图 3 可知,载体蛋白 BSA 和 OVA 的特征吸收峰出现在 280 nm 处,巴氯芬的特征吸收峰出现在约 265 nm 处;人工抗原 BA-BSA 和 BA-OVA 在约 275 nm 处出现特征吸收峰,相比 BSA、OVA 和巴氯芬发生明显偏移,表明巴氯芬与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联成功。

2.1.2 SDS-PAGE 结果 由图 4 可知,BA-BSA 电泳条带的迁移速率小于 BSA,说明合成的人工抗原分子质量大于载体蛋白分子质量,进一步表明巴氯芬与蛋白载体偶联成功。

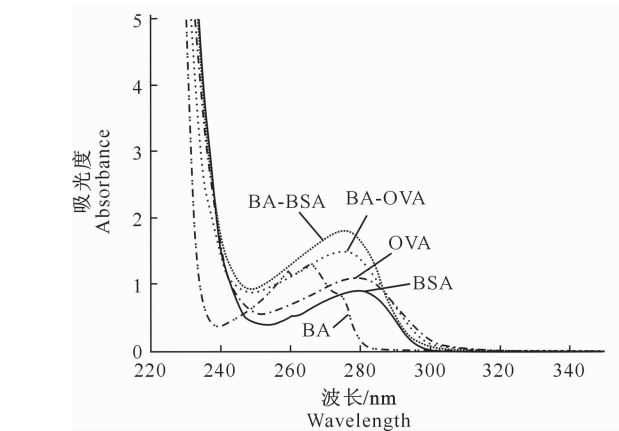


图 3 BA-BSA 的紫外扫描鉴定

Fig. 3 Identification of BA-BSA by UV scanning

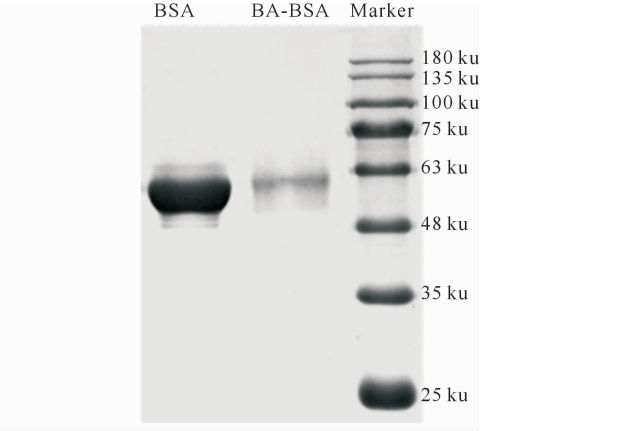


图 4 BA-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 Identification of BA-BSA by SDS-PAGE

2.2 巴氯芬多克隆抗体的效价

由表 1 可知,4 只小鼠多克隆抗体效价均达到

1 : 25 600,说明 BA-BSA 具有良好的免疫原性。

表 1 巴氯芬多克隆抗体效价测定结果

Table 1 Titer determination of baclofen polyclonal antibody

小鼠编号 No.	多克隆抗体稀释度 Polyclonal antibody dilution								空白对照 Blank control
	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600	
1	1.897	1.210	0.904	0.635	0.542	0.385	0.219	0.201	0.073
2	2.026	1.277	0.874	0.583	0.420	0.339	0.235	0.196	0.082
3	1.956	1.537	1.150	0.831	0.569	0.421	0.251	0.223	0.064
4	1.518	0.801	0.550	0.398	0.326	0.261	0.217	0.202	0.087

注:表中数据为 OD_{450} 值。表 2 同。
Note:Data in the table is OD_{450} . The same as table 2.

2.3 巴氯芬多克隆抗体的敏感性

由表 2 可知,巴氯芬对 4 只小鼠多克隆抗体与

包被抗原的结合均产生了抑制效果,表明多克隆抗体对巴氯芬具有一定的敏感性,其中 3 号小鼠多克

隆抗体的敏感性最好。图 5 为 3 号小鼠多克隆抗体抑制曲线,线性回归方程为 $y = -0.2797x + 0.8773$, R^2 为 0.9936。根据方程计算 IC_{50} 为

表 2 巴氯芬多克隆抗体敏感性的间接竞争 ELISA 鉴定结果

Table 2 Sensitivity identification of baclofen polyclonal antibody by indirect competitive ELISA

小鼠编号 No.	巴氯芬标准溶液质量浓度/(ng·mL ⁻¹) Concentration of baclofen standard solution										空白对照 Blank control
	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0	
1	0.198	0.251	0.326	0.413	0.511	0.640	0.756	0.821	0.926	0.870	0.068
2	0.313	0.336	0.362	0.398	0.479	0.549	0.665	0.798	0.816	1.012	0.081
3	0.116	0.225	0.336	0.412	0.482	0.552	0.641	0.778	0.859	1.065	0.061
4	0.289	0.315	0.369	0.436	0.546	0.582	0.598	0.653	0.768	0.876	0.071

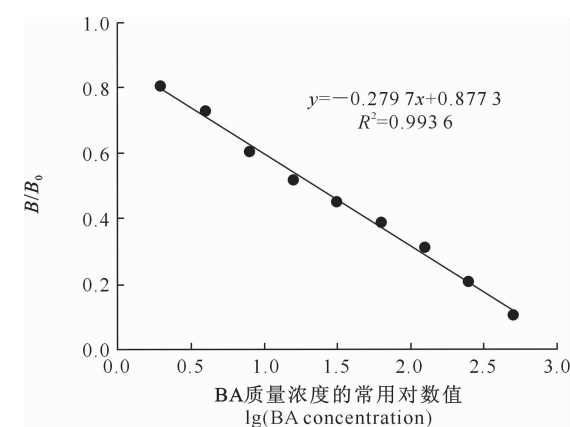


图 5 3 号小鼠多克隆抗体抑制曲线

Fig. 5 Inhibitive curve of No. 3 murine polyclonal antibody

2.4 巴氯芬多克隆抗体的特异性

巴氯芬多克隆抗体与γ-氨基丁酸、氯丙那林、可

22.33 ng/mL,表明所制备的巴氯芬多克隆抗体敏感性良好。

乐定等竞争物的交叉反应试验结果如表 3 所示。由表 3 可知,巴氯芬多克隆抗体与 γ-氨基丁酸及其他 6 种瘦肉精类药物交叉反应率均小于 0.3%,表明所制备的巴氯芬多克隆抗体具有较强的特异性。

3 讨论

饲料中一些物质的非法添加以及动物性食品中的兽药残留是养殖安全与食品安全的重要威胁,尤其是一些新型违禁添加物或替代物的出现,给动物性食品安全监控监管工作带来了新的挑战^[22]。液相色谱等传统仪器检测方法在监控工作中发挥了重要作用,但随着国家及地方监管部门抽检力度的加大,急需建立快速检测方法,以与传统确证方法进行互补,提高监控效率。

表 3 巴氯芬多克隆抗体与竞争物的交叉反应率

Table 3 Cross reactivity of baclofen polyclonal antibody with competitors

竞争物 Competitor	半数抑制浓度/ (ng·mL ⁻¹) IC ₅₀	交叉反应率/% CR	竞争物 Competitor	半数抑制浓度/ (ng·mL ⁻¹) IC ₅₀	交叉反应率/% CR
γ-氨基丁酸 γ-aminobutyric acid	>1.0×10 ⁴	<0.3	克伦特罗 Clenbuterol	>1.0×10 ⁴	<0.3
氯丙那林 Clorprenaline	>1.0×10 ⁴	<0.3	沙丁胺醇 Salbutamol	>1.0×10 ⁴	<0.3
可乐定 Clonidine	>1.0×10 ⁴	<0.3	莱克多巴胺 Ractopamine	>1.0×10 ⁴	<0.3
赛庚啉 Cyproheptadine	>1.0×10 ⁴	<0.3			

以 ELISA、ICA 为代表的免疫学检测方法具有灵敏、特异、便捷等优势,在实际抽检工作中能够起到高效筛查的作用^[23]。但免疫学快速检测方法在实际应用过程中会出现假阴性与假阳性等现象,因此必须依靠高亲和力的特异性抗体对检测方法进行优化和完善。本试验的研究对象巴氯芬属于小分子半抗原,本身不具有免疫原性,需偶联到载体蛋白上才可刺激机体免疫应答产生相应抗体^[24],而直接影响抗体特异性的半抗原分子结构设计以及人工抗原合成是获得免疫学特性良好的抗体的关键^[25]。巴氯芬的分子含有羧基和氨基,为避免偶联产生间隔臂,造成“臂抗体”出现,本试验采用 EDC 法通过羧

基将巴氯芬与载体蛋白偶联,合成人工抗原,利用紫外扫描对人工抗原偶联效果进行鉴定,并利用可判断分子质量大小的 SDS-PAGE 进一步鉴定人工抗原偶联效果,结果表明人工抗原的偶联效果良好,为获得免疫学特性良好的抗体奠定了基础。

用制备的人工抗原免疫小鼠制备多克隆抗体,效价达到 1:25 600,且多克隆抗体具有敏感性,其中 3 号小鼠多克隆抗体敏感性最好(IC_{50} 为 22.33 ng/mL),进一步表明所制备的人工抗原产生了良好的免疫效果。抗体特异性常以交叉反应率进行评价,交叉反应率越小,则特异性越强^[26],本试验采用间接竞争 ELISA 测定了多克隆抗体与其结构类似

物 γ -氨基丁酸以及氯丙那林等瘦肉精类违禁添加物的交叉反应率,结果表明多克隆抗体特异性良好,与竞争物的交叉反应可忽略,用于建立免疫学检测方法可有效排除其他药物干扰,提高检测结果的准确度。

综上所述,本试验制备了效价高、敏感性和特异性良好的巴氯芬多克隆抗体,为巴氯芬免疫学快速检测方法的建立奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Su K H, Young K N, Wook K Y. Successful intrathecal baclofen therapy for intractable paroxysmal sympathetic hyperactivity in patient with pontine hemorrhage: a case report [J]. *Clinical Neuropharmacology*, 2018, 41(4): 138-141.
- [2] Heetla H W, Staal M J, Proost J H, et al. Clinical relevance of pharmacological and physiological data in intrathecal baclofen therapy [J]. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2014, 95(11): 2199-2206.
- [3] 谢瑞满. 巴氯芬临床应用研究进展 [J]. *世界临床药物*, 2006, 27(3): 149-153.
- Xie R M. Progress in clinical application of baclofen [J]. *World Clinical Drugs*, 2006, 27(3): 149-153.
- [4] 郑秋红, 薛小波, 常 娟, 等. 抗热应激饲料添加剂对猪生长性能的影响及作用机理研究 [J]. *江西农业学报*, 2010, 22(12): 153-156.
- Zheng Q H, Xue X B, Chang J, et al. Study on effect of several anti-heat-stress feed additives on pig growth performance and their acting mechanisms [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(12): 153-156.
- [5] 黄士新, 李丹妮, 顾 欣, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中巴氯芬 [J]. *饲料研究*, 2013(5): 62-65.
- Huang S X, Li D N, Gu X, et al. Determination of baclofen in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Feed Research*, 2013(5): 62-65.
- [6] 王 政, 倪卫忠, 严敏鸣. 新型“瘦肉精”种类及其检测方法研究进展 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2013(2): 30-31.
- Wang Z, Ni W Z, Yan M M. Research progress on new types of “lean meat powder” and its detection method [J]. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013(2): 30-31.
- [7] 李 阳, 苏晓鸥, 王培龙, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中 3 种氯丙那林异构体和巴氯芬 [J]. *分析化学*, 2014, 42(4): 525-530.
- Li Y, Su X O, Wang P L, et al. Simultaneous determination of 3 kinds of isomers of clorprenaline and baclofen residues in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(4): 525-530.
- [8] Sullivan R, Hodgman M J, Kao L, et al. Baclofen overdose mimicking brain death [J]. *Clinical Toxicology*, 2012, 50(2): 141.
- [9] 王 霞, 康海燕. 中枢性肌松剂巴氯芬临床应用及不良反应 [J]. *临床医学*, 2011, 31(2): 114-115.
- Wang X, Kang H Y. Clinical application and adverse reactions of central muscle relaxant baclofen [J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2011, 31(2): 114-115.
- [10] Kiel L B, Hoegberg L C G, Jansen T, et al. A nationwide register-based survey of baclofen toxicity [J]. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2015, 116(5): 452-456.
- [11] Chiang M, Chang S Y, Whang C. Analysis of baclofen by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 877(1): 233-237.
- [12] Cao L W, Li C. Rapid and sensitive analysis of baclofen by high-performance liquid chromatography with UV-Vis and FD detection [J]. *Acta Chromatographica*, 2012, 24(3): 383-397.
- [13] Nahar L, Smith A, Patel R, et al. Validated method for the screening and quantification of baclofen, gabapentin and pregabalin in human post-mortem whole blood using protein precipitation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2017, 41(5): 441-450.
- [14] Peng D, Zhao L, Zhang L, et al. A novel indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay format for the simultaneous determination of ractopamine and phenylethanolamine A residues in swine urine [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(5): 1077-1085.
- [15] 王 瑞, 曹旭敏, 徐 军, 等. β_2 -受体激动剂类药物多残留间接竞争 ELISA 检测方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2020, 48(7): 37-43.
- Wang R, Cao X M, Xu J, et al. Development of an indirect competitive ELISA for detection of multiple residues of β_2 -agonist drugs [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2020, 48(7): 37-43.
- [16] Li H, Yang J, Bao D, et al. Development of an immunochromatographic strip for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Journal of Veterinary Science*, 2017, 18(3): 307-316.
- [17] 曹金博, 孟继秋, 李燕虹, 等. 强力霉素人工抗原的制备及鼠源多抗的 ELISA 鉴定 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35(12): 182-188.
- Cao J B, Meng J Q, Li Y H, et al. Preparation of artificial antigen and ELISA identification of mouse polyclonal antiserum for the detection of doxycycline [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2019, 35(12): 182-188.
- [18] Wang Y, Deng R, Zhang G, et al. Rapid and sensitive detection of the food allergen glycinin in powdered milk using a lateral flow colloidal gold immunoassay strip test [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(8): 2172-2178.
- [19] 闫瑞杰, 张云飞, 刘玲玲, 等. 猪 δ 冠状病毒 N 蛋白的原核表达和间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2019, 47(10): 1-8.
- Yan R J, Zhang Y F, Liu L L, et al. Prokaryotic expression of N protein and establishment of an indirect ELISA for antibody

detection of porcine deltacoronaviru [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2019, 47(10): 1-8.

[20] Li Z, Wang Y, Li D, et al. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening ethopabate residue in chicken muscle and liver [J]. RSC Advance, 2017, 7: 36072-36080.

[21] Chen X, Li Z, Sun F, et al. An innovative hapten and monoclonal antibody-based immunoassay for determining tebuconazole residues in aqueous samples [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 677-691.

[22] Guo M Y, Sun L, Liu L Q, et al. Ultrasensitive immunochromatographic strip for detection of cyproheptadine [J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 941-952.

[23] Sun Y N, Yang J F, Yang S Z, 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.

[24] Yin M, Hu X, Sun Y, et al. Broad-spectrum detection of zeranol and its analogues by a colloidal gold-based lateral flow immunochromatographic assay in milk [J]. Food Chemistry, 2020, 321: 126697.

[25] 宋 娟, 王榕妹, 王悦秋, 等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备 [J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1211-1218.

Song J, Wang R M, Wang Y Q, et al. Hapten design, modification and preparation of artificial antigens [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(8): 1211-1218.

[26] Yang X, Wang Y, Yang J, et al. An immunochromatographic lateral flow strip test for the rapid detection of danofloxacin in milk [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(11): 2430-2437.

(上接第 37 页)

[25] 王小刚, 王迎宾, 叶 婷, 等. 三疣梭子蟹生长特性的初步分析 [J]. 海洋湖沼通报, 2018(2): 131-136.

Wang X G, Wang Y B, Ye T, et al. A preliminary analysis of the growth characteristics of *Portunus trituberculatus* [J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2018(2): 131-136.

[26] 丛旭日, 李秀启, 董贯仓, 等. 黄河口中华绒螯蟹野生群体生长特征研究 [J]. 水生态学杂志, 2018, 39(6): 81-86.

Cong X R, Li X Q, Dong G C, et al. Growth characteristics of wild *Eriocheir sinensis* in yellow river estuary [J]. Journal of Hydroecology, 2018, 39(6): 81-86.

[27] 冯彬彬, 张清科, 高心明, 等. 池塘养殖条件下台湾泥鳅大规格鱼种的生长特性 [J]. 宁波大学学报(理工版), 2019, 32(6): 43-48.

Feng B B, Zhang Q K, Gao X M, et al. Growth characteristics of large-sized fingerlings *Paramisgumus dabryanus* ssp. in pond culture [J]. Journal of Ningbo University(Natural Science & Engineering Edition), 2019, 32(6): 43-48.

[28] Reyes-Bonilla H, Calderon-Aguilera L E, Galaviz-Lopez J M, et al. Size and relative condition index of the brown sea cucumber *Isostichopus fuscus* in the northern gulf of California, Mexico [J]. Latin American Journal of Aquatic Research, 2018, 46(4): 831-836.

[29] 平洪领, 余方平, 张 涛, 等. 斑鲈仔、稚鱼形态发育及异速生长模式研究 [J]. 水生生物学报, 2019, 43(5): 1021-1033.

Ping H L, Yu F P, Zhang T, et al. Morphological development and allometric growth pattern of *Konosirus punctatus* at larvae and juvenile stages [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(5): 1021-1033.