

间接 ELISA 法检测羊促乳素抗体方法的建立

于秋丽^a, 赵晓娥^a, 胡林勇^a, 陈玉林^b, 马保华^a

(西北农林科技大学 a 动物医学院; b 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**建立促乳素单克隆抗体制备中筛选阳性分泌细胞的间接 ELISA 检测方法。**【方法】**用促乳素纯品与 Freund 佐剂免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 初次免疫采用抗原与完全 Freund 佐剂, 每 2 周免疫 1 次, 从第 2 次开始采用抗原与不完全 Freund 佐剂, 免疫 4 次后尾静脉采血, 收集血清制备阳性对照抗体, 以未免疫的 BALB/c 小鼠血清为阴性对照, 筛选间接 ELISA 法检测促乳素抗体的最佳反应条件, 并对单克隆抗体制备中的阳性细胞进行筛选。**【结果】**间接 ELISA 法的最佳反应条件: 血清稀释倍数为 1 : 200, 抗原包被质量浓度为 100 ng/mL, 封闭液为 1% 牛血清白蛋白, 酶标抗体的工作浓度为 1 : 10 000, 酶标抗体作用时间为 37 °C 90 min, 底物作用时间 37 °C 30 min。用该方法检测融合的杂交瘤细胞, 最终获得 OD₄₅₀ 为 0.875 和 0.460 的阳性细胞株。**【结论】**建立了检测促乳素抗体的间接 ELISA 检测方法, 该方法方便易行。

[关键词] 促乳素; 抗体; 间接 ELISA 法

[中图分类号] S826.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0047-05

Establishment of an indirect ELISA for detection of the antibody of prolactin

YU Qiu-li^a, ZHAO Xiao-e^a, HU Lin-yong^a, CHEN Yu-lin^b, MA Bao-hua^a

(a. College of Animal Veterinary Medicine, b. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The research was to filter the optimal conditions of enzyme-linked immunosorbent assay to detect the antibody of prolactin, then establish an indirect enzyme-linked immunosorbent assay to screen the the positive cells in the production of monoclonal antibody. **【Method】** Female BALB/c mice of eight weeks old were immunized with prolactin and Freund adjuvant. The mice were immunized every two weeks, using prolactin and complete Freund adjuvant for the first time, and prolactin and incomplete Freund adjuvant for the others. After four times of immunization, the serum was used as positive control. Serum of unimmunized BALB/c mice was used as negative control to filter the optimal condition of indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **【Result】** The optimal conditions of this experiment were as follows: coating concentration of antigen was 100 ng/mL, confining liquid 1% BSA, optimal dilution of enzyme enzyme labelled antibody 1 : 10 000, action time of enzyme labeled antibody 90 min at 37 °C, action time of substrate 30 min at 37 °C. **【Conclusion】** Improved reaction conditions of indirect enzyme-linked immunosorbent assay was constituted and this way can be used to select the antibody of prolactin.

Key words: prolactin; antibody; indirect enzyme-linked immunosorbent assay

* [收稿日期] 2008-04-08

[基金项目] 农业部产业结构调整项目(05-07-03B); 陕西省科学技术研究发展计划项目(2005K02-G4-1)

[作者简介] 于秋丽(1980-), 女, 河南郟城人, 在读硕士, 主要从事单克隆抗体制备研究。

[通信作者] 马保华(1965-), 男, 陕西城固人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物胚胎生物技术研究。

E-mail: mabh@nwsuaf.edu.cn

促乳素 (prolactin, PRL) 为腺垂体促乳素细胞分泌的肽类激素, 在人类和动物生殖中具有促进乳腺发育、启动和维持泌乳的作用^[1]。在家畜, 尤其是在羊的繁殖中, 产后生理性的高促乳素水平会抑制卵巢功能, 表现为卵巢中无卵泡发育和排卵, 使母羊产后哺乳期间不能配种妊娠, 从而延长羊的产羔间隔。在肉羊生产中, 提高养殖效益的最有效途径之一, 就是尽可能地缩短母羊产羔间隔。而缩短产羔间隔最有效的措施是, 在早期断奶和改善母羊营养状况等措施的基础上, 尽快降低母羊促乳素水平, 恢复卵巢活动。研究表明, 溴隐亭可有效降低促乳素水平, 促进母羊卵巢功能的恢复和发情^[2-4]。快速降低母羊体内促乳素分泌的另一条途径是, 使用促乳素多克隆或单克隆抗体。后者还有望开发为现场快速检测促乳素水平的诊断试剂盒, 替代促乳素放射免疫测定, 以快速挑选适宜于采取卵巢功能恢复措施的母羊。

在促乳素单克隆抗体的制备过程中, 抗体阳性分泌细胞的筛选是最关键的步骤之一。间接 ELISA 检测方法具有特异性强、敏感性好等优点, 是单克隆抗体制备中筛选阳性分泌细胞主要的检测方法。由于抗原及其单克隆抗体性质的不同, 所建立的检测抗体的间接 ELISA 方法也有所不同。目前, 关于羊 PRL 单克隆抗体的间接 ELISA 检测方法尚未见报道。为此, 本研究从抗原包被质量浓度、血清稀释度、封闭液选择、酶标二抗工作浓度和作用时间、底物作用时间等 6 个方面, 筛选间接 ELISA 检测羊促乳素单克隆抗体的最佳反应条件, 建立一套灵敏可靠的间接 ELISA 检测方法, 以期促乳素单克隆抗体制备中阳性分泌细胞的筛选奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物及细胞 6~8 周龄、体质量 16~20 g, SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 10 只, 购自第四军医大学, 按常规方法饲养。SP/20 骨髓瘤细胞, 购于第四军医大学免疫学实验室。

1.1.2 主要试剂及其配制 DMEM 培养基, HAT 液 (氨基喋呤、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷), HT 液 (次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷), 8-氮杂鸟嘌呤 (8-Ag), 均为 Gibco 公司产品。四甲基联苯胺液 (TMB, Sigma, 用二甲基亚砜配成 1% 浓度, 4 ℃ 保存, 3 个月内使用); HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体和小鼠 IgG (中杉金桥生物公司); 洗涤缓冲液 (含吐温-20 的

PBS, 4 ℃ 保存备用); 包被缓冲液 (碳酸盐缓冲液); 封闭液: 分为 3 种, 即含体积分数 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 液, 含体积分数 10% 新生牛血清 (NBS) 的 PBS 液, 含质量分数 5% 脱脂奶粉的 PBS 液; 底物液: 用 0.1 mol/L 柠檬酸液 24.3 mL、0.2 mol/L Na₂HPO₄ 液 25.7 mL、四蒸水 50 mL 混合, 临用时用上述混合液 9.9 mL 加入 1% TMB 0.1 mL (TMB 底物液), 再加入 10 μL H₂O₂ 即为底物液。

1.2 抗原液及 Freund 佐剂的制备

1.2.1 抗原液 称取 0.9 mg PRL (Sigma), 溶于 9 mL 灭菌生理盐水中, 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 Freund 佐剂 称取羊毛脂 8.40 g 置于乳钵中, 量取液体石蜡 50 mL, 逐滴缓慢加入乳钵内, 边滴加边向一个方向碾磨, 使其成为粘稠的乳状, 即为不完全 Freund 佐剂。取出 5 mL 不完全 Freund 佐剂, 置于带玻璃珠的三角瓶内, 称取 10 mg 经 56 ℃、0.5 h 灭活的卡介苗, 加入三角瓶内充分摇匀, 制得完全 Freund 佐剂。将含有 Freund 佐剂的三角瓶在 115 ℃、15 min 高压灭菌, 4 ℃ 保存备用。

1.3 血清的制备

1.3.1 BALB/c 小鼠抗血清 将 0.1 mL 抗原液和等量的完全 Freund 佐剂混匀, 颈背部皮下多点注射进行免疫^[5]; 从第 2 次免疫起, 佐剂改为不完全 Freund 佐剂^[6], 与抗原液比例仍为 1:1。每隔 2 周免疫 1 次。第 4 次免疫 1 周后断尾采血, 室温静置, 分离血清, -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 阴性血清 试验小鼠尾静脉采血, 分离血清, -20 ℃ 保存备用。

1.4 间接 ELISA 最佳反应条件的确定^[7]

1.4.1 酶标二抗的稀释浓度 用 100 ng/mL 小鼠 IgG 进行包被, 洗涤; 将 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体分别进行 1:2 500, 1:5 000, 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000, 1:80 000 稀释, 加入已包被的孔中, 每个稀释度做 5 孔, 孵育, 洗涤; 加底物显色。加酸终止反应后, 测定 OD₄₅₀ (OD₄₅₀ 为 1.0 左右时, 酶标二抗的稀释度可作为其工作浓度^[8])

1.4.2 抗原包被和待检血清最佳稀释倍数的确定 以 pH 9.6 的包被缓冲液将抗原稀释为 100, 10, 1, 0.1 和 0.01 μg/mL, 每个稀释度做 5 孔, 4 ℃ 包被 24 h, 然后用含 0.05% 吐温-20 的 PBS (0.05% PBST) 洗涤 3 次, 每次 3 min; 加入含体积分数 10% NBS 的 PBS 液, 100 μL/孔, 4 ℃ 封闭 24 h, 0.05% PBST 洗涤; 将阳性血清分别按 1:50, 1:100,

1 : 200, 1 : 400 稀释, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 进行方阵试验, 再用 0.05% PBST 洗涤; 将酶标二抗按照筛选出的最佳工作浓度稀释后加入, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 0.05% PBST 洗涤; 加入 TMB 底物液, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 用 1 mol/L 的 H_2SO_4 10.0 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应后, 酶标仪测定 OD_{450} 值, 筛选抗原最佳包被质量浓度和血清的最佳稀释倍数。

1.4.3 封闭液的选择 抗原包被 96 孔酶标板后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别用质量分数 1% BSA、体积分数 10% 小牛血清和体积分数 5% 脱脂奶粉, 对 96 孔酶标板的未吸附部位封闭 24 h, 按照 ELISA 操作程序测定结果, 比较各组的 OD_{450} 及 P/N, 筛选出最佳的封闭液。

1.4.4 酶标二抗作用时间的确定 用筛选出的最佳封闭液对酶标板进行封闭, 然后加入按最佳稀释倍数稀释的待检血清, 孵育后加酶标二抗, 分别以 30, 60, 90 和 120 min 作为酶标二抗作用时间进行 ELISA 测定, 筛选最佳酶标二抗作用时间。

1.4.5 底物作用时间的确定 酶标二抗孵育后加底物, 分别于加底物 10, 20, 30 和 40 min 后终止反应, 筛选最佳底物作用时间。

1.4.6 终止液浓度的确定 分别用 1 mol/L 和 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 以筛选最佳终止液浓度。

1.5 饲养细胞的制备

按照文献[9]的方法进行。颈椎脱臼法处死小鼠, 浸泡于体积分数 75% 酒精中消毒 5 min, 腹部朝上固定于超净工作台内的解剖台板上。用镊子提起小鼠腹部皮肤, 暴露腹膜(勿剪破腹膜)。酒精棉球消毒腹膜后, 用注射器将 DMEM 基础培养液 8 mL 注入小鼠腹腔, 轻轻按摩腹部 1~2 min。用注射器抽回腹腔内液体, 注入离心管内离心, 弃上清。再用含吐温-20 的 PBS 液离心洗涤 1 次, 弃上清。用 HAT 液将沉淀细胞悬浮并混匀, 计数, 根据计数结果补加 HAT 液, 使细胞浓度调整为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。将细胞悬液加入 96 孔板内, 每孔 0.1 mL。

1.6 骨髓瘤细胞的培养

选用与待融合的脾细胞同源的 Sp2/0 骨髓瘤细胞, 在体积分数 10% NBS 的 DMEM 中常规培养^[10], 培养初期 2~3 d 换液 1 次, 后期每天换液 1 次, 细胞铺满培养瓶细胞生长面 80% 时传代。细胞融合前, 用弯头滴管将细胞从瓶底轻轻吹下, 收集于 50 mL 离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min。弃上清, 细胞沉淀中加入 30 mL 不完全培养液, 重复离心 1

次, 细胞重悬至 10 mL。取瘤细胞悬液, 加台盼兰染液以备活细胞计数。

1.7 细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

按照文献[9]和[10]的方法进行饲养层和骨髓瘤细胞的制备和培养。小鼠末次免疫后第 3 天^[11], 无菌采集脾脏, 将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1 : 5 进行融合^[12-13]。将融合得到的细胞悬液加入已铺有饲养层的 96 孔培养板, 每孔 100 μL , 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 的培养箱内培养。每隔 3~4 d 半量换液 1 次。第 10 天开始用建立的间接 ELISA 法, 对各培养孔上清进行检测, 选择阳性孔进行克隆化, 细胞长满孔底约 1/4 时再用该方法进行第 2 次检测, 检测结果仍为阳性的孔扩大培养^[14]。

2 结果与分析

2.1 酶标二抗工作浓度的确定

当酶标抗体稀释度分别为 1 : 2 500, 1 : 5 000, 1 : 10 000, 1 : 20 000 和 1 : 40 000 时, OD_{450} 分别为 1.740 5, 1.455 0, 1.043 0, 0.610 5 和 0.329 5。由此可以看出, 当酶标抗体稀释度为 1 : 10 000 时, OD_{450} 最接近 1, 因此确定酶标二抗的最佳工作浓度为 1 : 10 000。

2.2 抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释倍数的确定

从表 1 可以看出, 随着抗原质量浓度的降低, 阳性、阴性血清的 OD_{450} 逐渐降低, 但阳性血清和阴性血清的 OD_{450} 比值(P/N)逐渐增大。随着抗原稀释倍数的增加, 阳性和阴性血清的 OD_{450} 逐渐降低, 由于阳性 OD_{450} 变化较快, 而阴性 OD_{450} 变化不明显, 所以 P/N 逐渐缩小; 当抗原质量浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 待检血清 1 : 200 倍稀释时, 阳性血清 OD_{450} 为 1.028 4, 约等于 1, 阴性血清 OD_{450} 为 0.074 3, 小于 0.1, P/N 最大为 13.841 2, 因此确定抗原的包被浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 血清的最佳稀释倍数为 1 : 200。

2.3 封闭液的选择

由表 2 可以看出, 抗原在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下包被 24 h, 用 1% BSA 封闭液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 24 h, P/N 最高, 封闭效果最好。因此, 选择 1% BSA 作为封闭液。

2.4 酶标二抗作用时间的确定

由表 3 可以看出, 酶标二抗作用时间为 90 min 时, 阳性血清 OD_{450} 最大, 且 P/N 最大, 因此确定酶标二抗的最佳作用时间为 90 min。

表 1 不同抗原质量浓度和血清稀释倍数的 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA detection results of different antigen mass concentration and serum dilution

血清稀释倍数 Dilution of serum	血清 Serum	OD ₄₅₀				
		抗原质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Mass concentration of antigen				
		100	10	1	0.1	0.01
1 : 50	阳性 Positive	3.118 2	2.485 3	1.688 7	1.489 6	1.256 8
	阴性 Negative	0.307 0	0.225 4	0.135 6	0.116 5	0.098 8
	P/N	10.157 0	11.026 2	12.453 5	12.786 3	12.720 6
1 : 100	阳性 Positive	2.695 2	2.065 9	1.658 7	1.328 7	0.935 6
	阴性 Negative	0.252 6	0.175 4	0.124 5	0.106 8	0.076 8
	P/N	10.669 8	11.778 2	13.322 9	12.441 0	12.182 3
1 : 200	阳性 Positive	2.156 4	1.687 5	1.389 6	1.028 4	0.857 4
	阴性 Negative	0.216 5	0.143 6	0.108 8	0.074 3	0.073 6
	P/N	9.960 3	11.751 4	12.772 1	13.841 2	11.649 5
1 : 400	阳性 Positive	1.953 6	1.326 5	1.264 5	0.867 5	0.420 3
	阴性 Negative	0.165 8	0.112 6	0.098 8	0.068 5	0.058 9
	P/N	11.782 9	11.780 6	12.798 6	12.664 2	7.135 8

表 2 不同封闭液的 ELISA 检测结果

Table 2 Results of ELISA with different confining liquid

封闭液 Confining liquid	OD ₄₅₀		P/N
	阳性 Positive	阴性 Negative	
1% BSA	0.838 0	0.125 0	6.704
10% NBS	0.675 0	0.107 0	6.308
5% 脱脂奶粉 Defatted milk powder	0.370 0	0.096 0	3.854

表 3 不同酶标二抗作用时间的 ELISA 检测结果

Table 3 Results of ELISA with different acting time

反应时间/min Time of reaction	OD ₄₅₀		P/N
	阳性 Positive	阴性 Negative	
30	0.837	0.074	11.310 8
60	0.983	0.082	11.987 8
90	1.216	0.085	14.305 9
120	0.953	0.099	9.626 3

2.5 底物作用时间的确定

由表 4 可以看出,底物作用 30 min 时,阳性血清 OD₄₅₀ 最大,且 P/N 最大,随着作用时间的延长,阳性血清 OD₄₅₀ 逐渐降低,阴性血清变化不明显,P/N 也逐渐降低。因此,确定 30 min 为底物的最佳作用时间。

表 4 底物作用时间的 ELISA 检测结果

Table 4 Results of ELISA with different acting time

反应时间/min Time of reaction	OD ₄₅₀		P/N
	阳性 Positive	阴性 Negative	
10	0.764 3	0.082 1	6.422 7
20	0.913 0	0.085 3	7.246 0
30	1.126 4	0.087 6	12.858 4
40	0.906 5	0.087 0	10.419 5

2.6 终止液浓度的确定

分别以 1 mol/L 和 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,结果显示二者差异不显著,因此选择 1 mol/L H₂SO₄ 为终止液。

2.7 筛选出的阳性株

用建立的间接 ELISA 法检测融合的杂交瘤细胞,经过多次筛选,最终获得 OD₄₅₀ 分别为 0.875 和 0.460 的阳性细胞株。

3 讨论

目前,检测人血清 PRL 的方法主要有放射免疫法和磁控酶联免疫试剂盒法,所用抗体均为进口抗体^[15],而有关羊促乳素的检测方法尚未见报道。进口抗体价格高昂,一般用于人血清 PRL 的检测和高促乳血症的治疗,不适合兽医临床应用,本试验所建立的间接 ELISA 检测方法灵敏度高、费用低,可广泛用于兽医临床实践中。

本研究对 ELISA 反应条件进行了初步探索,优化了最适抗原包被质量浓度、血清稀释倍数、酶标二抗工作浓度和反应时间、封闭液的选择及底物反应时间,建立了用促乳素纯品作为包被抗原的间接 ELISA 检测方法,通过对单克隆抗体制备中阳性细胞的筛选,表明该方法方便易行。间接 ELISA 因特异性强,敏感性高等优点而成为最常用的检测方法^[16]。

[参考文献]

- [1] 张家骅. 家畜生殖内分泌学 [M]. 北京: 中国文化教育出版社, 2003: 105.
Zhang J H. Reproductive endocrinology in domestic animals [M]. Beijing: Chinese Education and Civilization Press, 2003: 105. (in Chinese)
- [2] Land R B, Carr W R, McNeillly A S. Plasma FSH, LH, the positive feedback of oestrogen, ovulation and luteal function in the ewe given bromcriptine to suppress proactin during seasonal anoestrus [J]. J Reprod Fert, 1980, 59: 73-78.

- [3] Picazo R A, Bulnes G, Brunet G, et al. Effects of bromocryptine administration during the follicular phase of the oestrus cycles on prolactin and gonadotrophin secretion and follicular dynamics in Merino monovular ewes [J]. *J Reprod Fert*, 2000, 120: 177-186.
- [4] 张一玲, 渊锡藩, 王 斌. 泌乳奶山羊非繁殖季节诱发发情研究 [J]. *西北农业大学学报*, 1990, 18(1): 29-33.
Zhang Y L, Yuan X F, Wang B. Study of evocation heat of actigenous milk goats in nonbreeding season [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 1990, 18(1): 29-33. (in Chinese)
- [5] Suzuki N, Wakasug M, Seigo N, et al. Production and application of new monoclonal antibodies specific for a fecal helicobacter pylori antigen [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002, 9(1): 75-78.
- [6] Venien A, Levieux D, Astier C. Production and epitopic characterization of monoclonal antibodies against bovine β -Lactoglobulin [J]. *Journal of Dairy Science*, 1997, 80(9): 1977-1987.
- [7] Dagainakatte G C, Bergstrom C C, Gordon A, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of elk coronavirus [J]. *Clinical and Laboratory Immunology*, 1999, 6(3): 341-344.
- [8] 焦 奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 104.
Jiao K, Zhang S S. Enzyme-linked immune analysis technology and application [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 104. (in Chinese)
- [9] 徐志凯. 实用单克隆抗体技术 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1991: 35.
Xu Z K. Technology of practicality monoclonal antibody [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1991: 35. (in Chinese)
- [10] 程宝鸾. 动物细胞培养技术 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1999: 112.
Cheng B L. Technology of animal cells culture [M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 1999: 112. (in Chinese)
- [11] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 2001: 485.
Wang S R, Wang X L, Han W Y. Immunology of modern times animals [M]. Changchun: Jilin Science and Technology Publishing House, 2001: 485. (in Chinese)
- [12] 王 捷. 动物细胞培养技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 36-41.
Wang J. Technology and application of animal cells culture [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 36-41. (in Chinese)
- [13] Kadivalt G V, Chapapas S D. Production, characterization, and species secificity of five monoclonal antibodies to mycobacterium tuberculosis [J]. *J Clin Mucribiol*, 1987, 25(1): 76-80.
- [14] Hack R, Martlbauer E, Terplan G. Production and characterization of monoclonal antibodies to the macrocyclic trichothecene roridin A [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(9): 2328-2330.
- [15] 李留安, 王月影, 王艳玲, 等. 催乳素的研究进展 [J]. *河北畜牧兽医*, 2004, 20(9): 21-22.
Li L A, Wang Y Y, Wang Y L, et al. Research of prolactin [J]. *Hebei Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2004, 20(9): 21-22. (in Chinese)
- [16] 刘剑郁, 李晓成, 陈德坤, 等. 间接 ELISA 检测犬细小病毒病血清抗体方法的建立 [J]. *中国动物检疫*, 2006, 23(3): 27-29.
Liu J Y, Li X C, Chen D K, et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection canine minute virus [J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2006, 23(3): 27-29. (in Chinese)

(上接第 46 页)

- [16] Muntanjola-Cvetkovic M, Ristanovic B. A new species of *Embellisia* isolated from sea water [J]. *Mycologia*, 1976, 68(1): 47-51.
- [17] Simmons E G. An aggregation of *Embellisia species* [J]. *Mycotaxon*, 1983, 17: 216-241.
- [18] Simmons E G. *Embellisia* and related teleomorphs [J]. *Mycotaxon*, 1990, 38: 251-265.
- [19] David J C, Coles K, Fisher J, et al. A new species of *Embellisia* from soil with levels of heavy metals [J]. *Mycoscience*, 2000, 41(6): 533-537.
- [20] 赵兴华, 崔忠华, 耿果霞, 等. 气相色谱-甲基化- α -D-甘露糖苷内标法测定变异黄芪中的苦马豆素 [J]. *色谱*, 2007, 25(5): 781-782.
Zhao X H, Cui Z H, Geng G X, et al. Gas chromatography-methyl- α -D-mannopyranoside internal standard determine the swainsonine concentration in *Astragalus variabilis* Bunge [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007, 25(5): 781-782. (in Chinese)
- [21] 史志诚. 动物毒理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
Shi Z C. Animal toxicology [M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 2001. (in Chinese)