

陈观银, 黄显会, 刘晓云, 等. 一种新的沙丁胺醇人工抗原的合成及单克隆抗体的制备[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(1): 23-28.

一种新的沙丁胺醇人工抗原的合成及单克隆抗体的制备

陈观银¹, 黄显会¹, 刘晓云², 邓发亮², 李帅鹏¹, 孔祥凯¹, 怀彬彬¹

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广州万孚生物技术股份有限公司, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为证明采用4-溴丁酸乙酯半抗原合成人工抗原可制备灵敏度高、特异性好的单克隆抗体。【方法】将硫酸沙丁胺醇(SAL)与4-溴丁酸乙酯反应制备半抗原(SAL-HS);通过N-羟基琥珀酰亚胺活化酯法合成免疫原与包被原,用聚丙烯酰胺凝胶电泳、紫外光谱和质谱方法对沙丁胺醇免疫原及包被原进行鉴定。免疫原免疫 Balb/c 小鼠,采用融合技术产生杂交瘤细胞株,体内诱生腹水法制备单克隆抗体,并鉴定其免疫学特性。【结果和结论】筛选出1株杂交瘤细胞株,其细胞培养上清液效价达1:128 000,腹水效价达1:2 560 000,免疫球蛋白亚型鉴定为IGg1;抗体对沙丁胺醇的半数抑制浓度(IC₅₀)为:0.746 ng/mL;与其他同类结构药物的交叉反应率均小于0.015%。

关键词:沙丁胺醇;单克隆抗体;胶体金;间接竞争 ELISA

中图分类号:S859

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2014)01-0023-06

Synthesis of a newly designed artificial antigen and preparation of a monoclonal antibody against salbutamol

CHEN Guanyin¹, HUANG Xianhui¹, LIU Xiaoyun², DENG Faliang²,
LI Shuaipeng¹, KONG Xiangkai¹, HUAI Binbin¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangzhou Wanfu Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To prove that the artificial antigen which was synthesised by 4-bromine ethyl butyrate was successful, and that the monoclonal antibody had a high sensitivity and specificity. 【Method】Salbutamol sulfate was connect with 4-bromine ethyl butyrate, then converted into haptent(SAL-HS). The immunogen SAL-BSA (salbutamol-bovine serum albumin) and coating antigen SAL-OVA (ovalbumin) were synthesized by the N-Hydroxy-succinimide active ester method. The conjugations were identified by SDS-PAGE, UV and mass spectrum. Balb/c mice were immunized by immunogen; splenocytes were fused with SP2/0 myeloma cells; hybridomas cells were produced for a monoclonal antibody by ascites *in vivo* to identify immunological characteristics. 【Result and conclusion】Cultural supernatants titer of hybridomas cells and ascites were 1:128 000 and 1:2 560 000 respectively; the subclasses of monoclonal antibody was IGg1; the IC₅₀ of standard curve was 0.746 ng/mL, with other drugs of similar structure showing cross-reactivity affinities being less than 0.015%.

Key words:salbutamol; monoclonal antibody; immunogen; ic-ELISA

收稿日期:2013-02-21 优先出版时间:2013-11-07

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20131107.1610.016.html>

作者简介:陈观银(1987—),女,硕士研究生,E-mail:344173825@qq.com;通信作者:黄显会(1969—),男,高级兽医师,博士,E-mail:xhhuang@scau.edu.cn

基金项目:国家科技支撑计划(2011BAK10B01-08)

沙丁胺醇(Salbutamol, SAL),又名舒喘宁、索布胺、阿布叔醇、羟甲异丁肾上腺素、羟甲叔丁肾上腺素等,化学名1-(4-羟基-3-羟甲基苯基)-2-(叔丁氨基)乙醇^[1],是一种人工合成的 β_2 肾上腺素受体激动剂(β_2 -激动剂)^[2],其中有活性作用的是R型沙丁胺醇,临床常用其硫酸盐形式治疗支气管哮喘^[3].此外,沙丁胺醇还具有一定的营养重分配作用^[4-5],摄入量过大时对心血管系统和神经系统会产生明显的刺激作用,引起肌肉颤抖、心悸、心慌、头疼、目眩,严重者恶心、呕吐等.由于沙丁胺醇对动物具有促进骨骼肌生长,减少脂肪蓄积作用,因而被国内外不少养殖场非法用作饲料添加剂,其残留严重危害着人们的身体健康和生命安全.为防止沙丁胺醇超标的畜产品进入市场,必须建立一种简便、快速、灵敏、准确的检测方法,对沙丁胺醇残留进行有效的监测.目前,沙丁胺醇的残留检测主要依靠理化检验方法,如气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)^[6-7]、气质联用(GC-MS)^[8-9]、液质联用(HPLC-MS)等^[10],尽管这些方法有很高的灵敏度和准确性,但存在需要昂贵的仪器、样品前处理复杂、繁琐费时、不能现场操作等缺陷,限制了理化检验方法的应用^[11].免疫学分析方法由于具有灵敏、快速、特异、简便等优点,近年来国内外在兽药、农药残留检测领域广泛应用^[12-16].本研究采用溴丁酸乙酯法合成沙丁胺醇免疫原,制备沙丁胺醇单克隆抗体,应用于胶体金平台,旨在为沙丁胺醇残留免疫学检测方法的建立奠定基础.

1 材料与方法

1.1 试剂

硫酸沙丁胺醇(江苏金坛)(结构见图1);4-溴丁酸乙酯(Sigma公司);牛血清白蛋白(BSA)、鸡

卵清白蛋白(OVA)(上海金穗生物科技有限公司);1-乙基3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)(阿拉丁试剂公司);PEG1500、弗氏完全佐剂、弗式不完全佐剂(Sigma公司);SP2/0细胞(广州万福生物技术公司);HAT、HT、RPMI-1640培养基(美国Gibico公司);其他试剂市售所得,均为AR级.

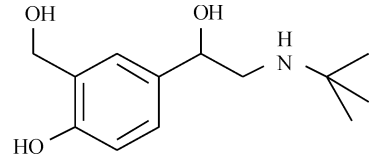


图1 沙丁胺醇化学结构

Fig. 1 The chemical structure of salbutamol

1.2 主要仪器

U3000紫外扫描仪(UV)(日本岛津公司);洗板机、酶联免疫检测仪、离心机(Thermo Scientific);磁力搅拌器(巩义市予华仪器);旋转蒸发仪(上海爱朗仪器);TC-2323CO2培养箱(SHELDON公司).

1.3 人工半抗原合成

硫酸沙丁胺醇500 mg(2.1 mmol)、碳酸钾718 mg(5.23 mmol)、4-正丁基碘化胺50 mg(0.135 mmol)、二甲基甲酰胺(DMF)5 mL、4-溴丁酸乙酯497 mg(密度为1.363 g/mL),按上述顺序依次加入开始反应,TLC板跟踪反应情况,大约反应24 h,用水和乙酸乙酯开始萃取,旋转蒸干,称其质量为776 mg,加氢氧化锂600 mg、水3.6 mL和乙醇3.6 mL开始水解.TLC板跟踪,反应1.5 h后,旋转蒸干乙醇,加入三氯甲烷除去碱性条件下不成盐的副产物,倒掉,加约1.5 mL水,调pH为3~5,然后加过量的无水硫酸钠、甲醇和乙酸乙酯(体积比2:8)开始萃取,蒸干有机相得目标产物(SAL-HS).反应原理见图2.

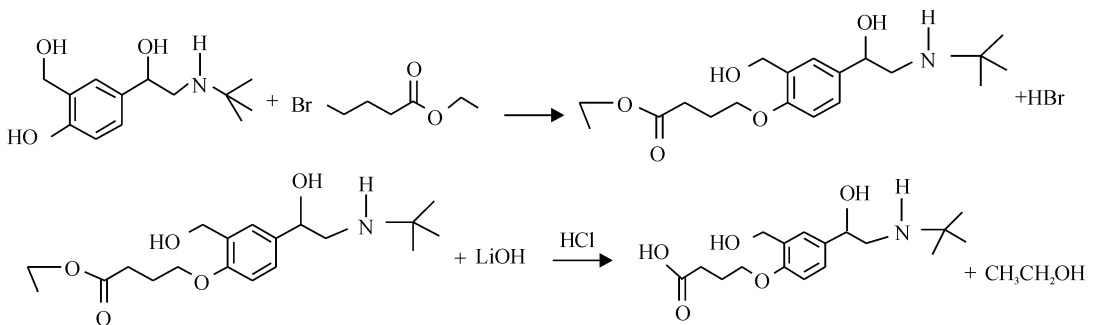


图2 半抗原合成过程

Fig. 2 The synthetic procedure for hapten

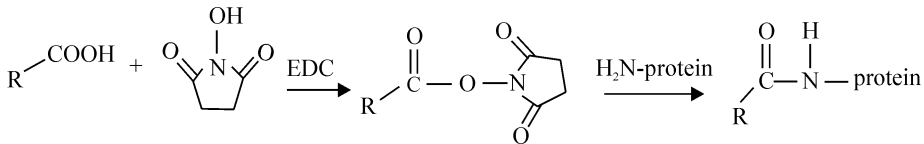
1.4 完全抗原的合成

半抗原(SAL-HS)与牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白偶联分别合成免疫原和包被原(图3)。

1.4.1 免疫原合成 将100 mg 4-溴丁酸乙酯沙丁胺醇半抗原溶于1 mL DMF中,取200 μ L该溶液加入1 mL DMF,再加入15 mg EDC、10 mg NHS,常温反应过夜.将40 mg 牛血清白蛋白溶于3 mL PBS(0.05 mol/L pH 7.4)中,将活化好的半抗原逐滴加入到溶于牛血清白蛋白的PBS中,室温磁力搅拌反应4 h,转入透析袋中开始透析(0.01 mol/L pH 7.4

PBS),3 d后,4 $^{\circ}$ C条件下保存备用。

1.4.2 包被原合成 将100 mg 4-溴丁酸乙酯沙丁胺醇半抗原溶于1 mL DMF中,取200 μ L该溶液加入1 mL DMF,再加入15 mg EDC、10 mg NHS,常温反应过夜.将100 mg 鸡卵清白蛋白溶于3 mL PBS(0.05 mol/L pH 7.4)中,将活化好的半抗原逐滴加入到溶于鸡卵清白蛋白的PBS中,室温磁力搅拌反应4 h,转入透析袋中开始透析(0.01 mol/L pH 7.4 PBS),3 d后,4 $^{\circ}$ C条件保存备用。



图中R代表半抗原(SAL-HS);protein为牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)。

图3 完全抗原合成过程

Fig.3 The synthetic procedure for complete antigen(R represents hapten)

1.5 抗原合成鉴定

1.5.1 完全抗原浓度的测定 采用福林酚法测定抗原的浓度^[17]。

1.5.2 偶联比测定 采用三硝基苯磺酸法测定免疫原和包被原偶联比^[18]。

1.5.3 紫外光谱鉴定 将抗原用水稀释到0.2 mg/mL,半抗原用少量DMF溶解,用水配成0.2 mg/mL牛血清白蛋白用水配成0.2 mg/mL,在200~400 nm范围内进行紫外扫描,可以很好地取得结果。

1.5.4 SDS-PAGE鉴定 配制各种电泳溶液,浓缩胶5%,分离胶12%。考马斯亮蓝染色液染色,用脱色液脱色至条带清晰。

1.5.5 半抗原质谱鉴定 参考毛利莎等^[3]质谱条件,进行沙丁胺醇半抗原的质谱全扫描。

1.6 沙丁胺醇单克隆抗体的制备

1.6.1 动物免疫 将免疫原SAL-BSA免疫5只Balb/c小鼠,分别标记为1、2、3、4、5,用牛血清白蛋白直接免疫Balb/c小鼠,作为空白对照组(标记为6),首免将等量的抗原与弗氏完全佐剂乳化,腹部皮下注射100 μ g/只,第2~第5次免疫,将等量免疫原与弗氏不完全佐剂乳化,皮下注射50 μ g/只,融合前3 d加强免疫,皮下注射免疫原50 μ g,免疫间隔时间为2周。

1.6.2 间接ELISA测定血清效价 小鼠五免后第7天采血测定其血清抗体效价。方法如下:将SAL-OVA包被原用碳酸缓冲液(pH 9.6)稀释成1.0 μ g/mL,包被96孔板,4 $^{\circ}$ C条件孵育过夜,洗板3次;加入倍

比稀释好的抗体,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C条件孵育1 h,洗板3次;加入羊抗鼠IgG-HRP,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C条件孵育40 min,洗板3次;加入显色液各50 μ L,37 $^{\circ}$ C条件显色10 min,0.2 mol/L硫酸终止反应,酶标仪450 nm读数。以 $S/N \geq 2.1$ 所对应的最大稀释倍数为阳性血清的抗体效价,其中S为阳性血清的 $D_{450 \text{ nm}}$,N为阴性血清的 $D_{450 \text{ nm}}$ 。

1.6.3 间接竞争ELISA测定血清 IC_{50} 根据1.6.2结果将 $D_{450 \text{ nm}}$ 在1.0左右的抗体稀释倍数作为最佳工作条件,按1.0 μ g/mL包被原包96孔板(100 μ L/孔),洗板3次;然后加入沙丁胺醇标准品(1、10、20、40、80 ng/mL)各50 μ L,再加入阳性血清50 μ L,使最终浓度为最佳工作浓度。37 $^{\circ}$ C竞争反应1 h,洗板3次;然后加入羊抗鼠IgG-HRP,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育40 min,洗板3次;再加入显色液,各50 μ L,37 $^{\circ}$ C显色10 min,0.2 mol/L硫酸终止反应,酶标仪450 nm读 $D_{450 \text{ nm}}$ 。

1.6.4 细胞融合 按常规方法融合,将SP2/0细胞与脾细胞以1:5(质量比)比例混合,然后,将细胞混匀加入甲基纤维素半固体培养基中培养。培养步骤:将离心好的融合细胞,去除上清液,加入4 mL血清,并将细胞吹匀;然后再加入6 mL血清、4 mL饲养细胞及0.8~1.0 mL的HAT(50 \times);向离心管中加入25 mL灭菌半固体培养基,定容至40 mL,并将其充分混匀,30 min后将融合好的细胞倒入小皿中,再将小皿放入湿盒中,最后放入37 $^{\circ}$ C、体积分数为5% CO_2 培养箱中培养。

1.6.5 阳性细胞克隆 检测细胞培养上清抗体效价,

选择强阳性细胞进行克隆,取 50 个细胞铺半块 96 孔板,亚克隆后第 4~5 天数板,挑选单克隆或克隆数少的孔换液,第 7~10 天后(细胞占视野的 25% 以上)即可 ic-ELISA 检测,直至 100% 阳性.得到稳定分泌高特异性、高效价、高亲和力抗体的杂交瘤细胞株,保存于液氮中.

1.6.6 单克隆抗体的制备及其效价和亚型检测 将克隆及扩大培养的杂交瘤细胞注入提前致敏的 Balb/c 小鼠腹腔,诱生腹水产生抗沙丁胺醇单克隆抗体.收集 5 mL 腹水进行抗体的纯化^[19],采用福林酚法测定抗体浓度;采用间接 ELISA 测定抗体效价;使用抗体亚型试剂盒(广州万孚生物技术责任有限公司产品)鉴定抗体亚型.

1.6.7 抗体灵敏度与特异性测定 参照 1.6.3,采用间接竞争 ELISA 法测定单克隆抗体的灵敏度和特异性.根据 IC_{50} 判定抗体灵敏度.检测抗沙丁胺醇单克隆抗体与沙丁胺醇、盐酸克伦特罗、莱克多巴胺等的交叉反应性,根据交叉反应率(Cross reaction, CR)判定抗沙丁胺醇单克隆抗体的特异性. $CR = (\text{沙丁胺醇的 } IC_{50} / \text{各结构类似物的 } IC_{50}) \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 半抗原质谱鉴定

溴丁酸乙酯半抗原相对分子质量为 325.12,由图 4 可见, H^+ 质谱出峰相对分子质量为 326.3,表明是本试验所合成的半抗原.

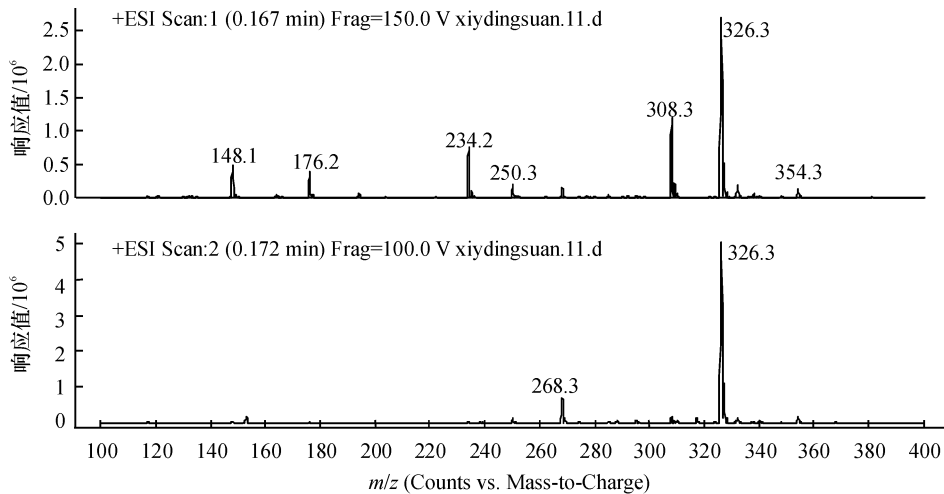


图 4 半抗原质谱图

Fig. 4 The mass spectrogram of SAL-HS

2.2 完全抗原鉴定

2.2.1 紫外光谱鉴定 由图 5 可见,沙丁胺醇半抗原(SAL-HS)的最大吸收峰在 275 nm,BSA 的最大吸收峰在 278 nm,沙丁胺醇半抗原和牛血清白蛋白偶联后在 240~300 nm 紫外吸收峰发生上移,表明偶联成功,依据三硝基苯磺酸法计算出沙丁胺醇半抗原和牛血清白蛋白结合比为 13:1.

由图 6 可见,沙丁胺醇半抗原(SAL-HS)的最大吸收峰在 275 nm,鸡卵清白蛋白的最大吸收峰在 279 nm,沙丁胺醇半抗原和鸡卵清白蛋白偶联后在 240~300 nm 紫外吸收峰发生上移,表明偶联成功,依据三硝基苯磺酸法推算出沙丁胺醇半抗原和牛血清白蛋白结合比为 3:1.

2.2.2 SDS-PAGE 鉴定 由图 7 可见,牛血清白蛋白相对分子质量为 67 000,而沙丁胺醇半抗原连接牛血清白蛋白后相对分子质量加大,迁移速度比牛血清白蛋白慢,由此可见合成完全抗原成功.

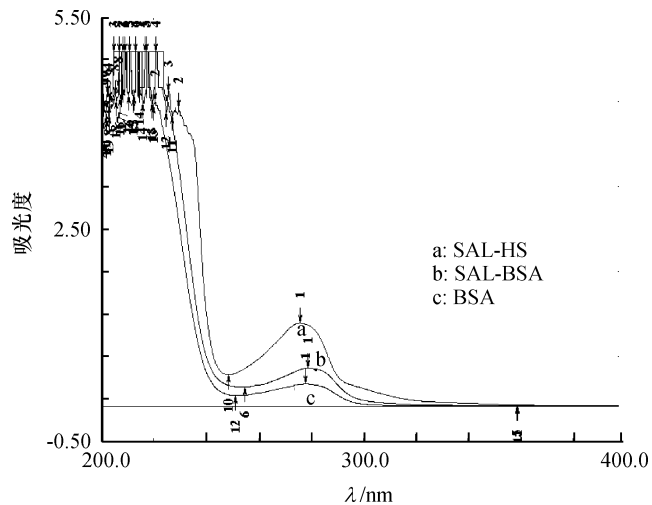


图 5 沙丁胺醇半抗原(SAL-HS)、牛血清白蛋白(BSA)、SAL-BSA 的紫外扫描光谱

Fig. 5 UV absorption spectra of bovine serum albumin (BSA), salbutamol hapten (SAL-HS), and coating antigen (SAL-BSA)

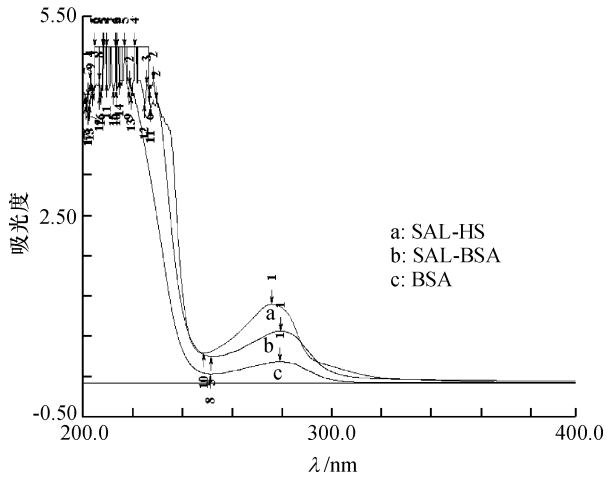
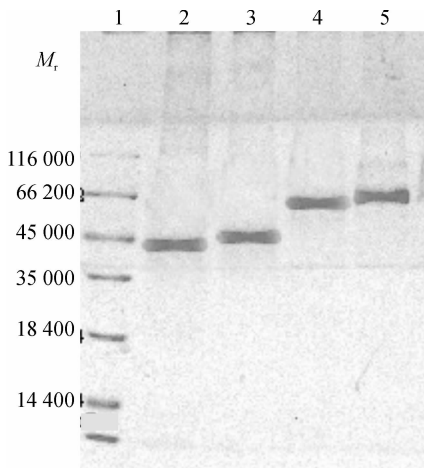


图6 沙丁胺醇半抗原 (SAL-HS)、鸡卵清白蛋白 (OVA)、SAL-OVA 的紫外扫描光谱

Fig. 6 UV absorption spectra of ovalbumin (OVA), salbutamol haptens (SAL-HS), and coating antigen (SAL-OVA)



1:蛋白质相对分子质量标准;2:鸡卵清白蛋白 (OVA);3:SAL-OVA;4:牛血清白蛋白 (BSA);5:SAL-BSA.

图7 载体蛋白和偶联物的 SDS-PAGE

Fig. 7 SDS-PAGE of carrier proteins and conjugates

2.3 小鼠融合前血清抗体效价及 IC₅₀测定

五免后第7天的5只小鼠中,2号小鼠效价可达1:128 000,其 IC₅₀为10.56 ng/mL.其他4只小鼠效价均可达1:64 000,其 IC₅₀>10.56 ng/mL.阴性对照小鼠的效价可以达1:2 000,但没有抑制,所以选择效价高、特异性好的2号小鼠进行融合.

2.4 小鼠杂交瘤细胞的建立

选择效价最高的2号小鼠进行融合.经阳性细胞克隆后,获得2株杂交瘤细胞,分别测定其 IC₅₀,筛选出1株高效价、敏感、特异的杂交瘤.

2.5 抗体的制备及纯化

将筛选得到的1株杂交瘤细胞注射到成年Balb/c小鼠腹腔,收集腹水,经蛋白纯化后,获得蛋白质量浓度为2.54 mg/mL.经间接ELISA效价检测,杂交

瘤细胞株的细胞培养上清液和腹水抗体效价分别为1:128 000和1:2 560 000,经抗体亚型鉴定,细胞株所分泌的抗体均为IgG1.

2.6 抗体灵敏度与特异性测定

根据间接竞争ELISA结果,拟合曲线可得,单克隆抗体的 IC₅₀为0.746 ng/mL(图8),与其他同类结构的交叉反应率均小于0.015%(表1).

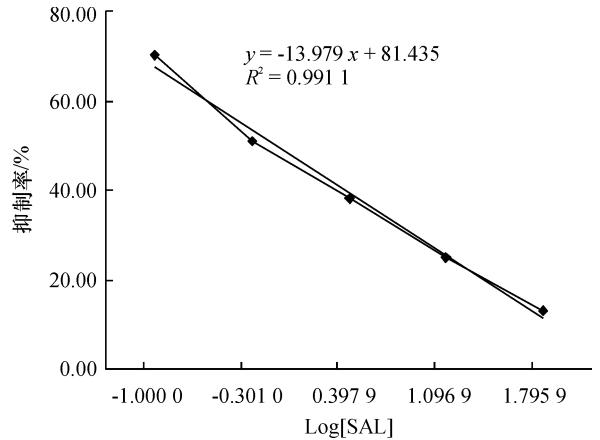


图8 抗沙丁胺醇单克隆抗体标准抑制回归曲线

Fig. 8 Inhibitory curve determined by indirect competitive ELISA

表1 单克隆抗体与沙丁胺醇及其同类结构药物交叉反应率

Tab.1 Cross-reactivity monoantibody with other drugs			
竞争物	交叉反应率/%	竞争物	交叉反应率/%
沙丁胺醇	100	福莫特罗	<0.010
特布他林	<0.01	盐酸克伦特罗	<0.015
沙美特罗	<0.01	莱克多巴胺	<0.015

3 讨论

沙丁胺醇是小分子,必须与大分子物质结合才具有免疫原性,而整个抗原合成中,半抗原结构设计尤为重要,直接影响动物的免疫效果,本研究的结构设计是新颖所在.以硫酸沙丁胺醇为原料,在酚羟基上接溴丁酸乙酯,因为沙丁胺醇相对分子质量很小,4-溴丁酸乙酯相对分子质量为195.05,增大相对分子质量同时,形成的醚链不容易水解,稳定性好,可以增强免疫原性.由于半抗原特殊结构,使得抗体与其他同类结构的交叉反应率小于0.015%,文献报道沙丁胺醇与克伦特罗有很高的交叉反应率^[20],这种半抗原结构的设计解决了交叉反应的问题,为创新所在.

免疫原偶联比为13:1,能产生效价高的抗体,偶联包被原的半抗原和鸡卵清白蛋白质量比为1:50,测得偶联比为2.5:1,包被原偶联比越低包被效果越好.

在免疫小鼠检测小鼠血清抗体效价和抑制时,

要选择效价高且抑制率高的小鼠进行融合,由于小鼠机体差异性,在免疫时应多免疫几只小鼠.由于融合时使用的是甲基纤维素半固体培养基,挑克隆之后要换全液,然后再检测效价和抑制,因为甲基纤维素半固体培养基可能会造成假阳性.

杂交瘤细胞株诱生腹水制备抗体的效价可达1:2 560 000,其 IC_{50} 可达到0.746 ng/mL,说明免疫原可以刺激动物机体产生免疫应答,从而制备高特异性的单克隆抗体.

免疫学方法具有灵敏度高、过程简单和分析速度快等优点,是监测食品安全很好的方法,将沙丁胺醇单克隆抗体应用到胶体金平台,省时、省力、成本低的胶体金试纸条,为沙丁胺醇残留检测提供了更加方便快速灵敏的方法,也为免疫学方法的建立奠定了基础,同时为胶体金试纸条的应用优化提供基础.

参考文献:

- [1] 袁利鹏,孙远明,雷红涛,等. 沙丁胺醇人工抗原合成及鉴定研究[J]. 食品科学, 2006(12): 276-280.
- [2] 吴玉苹,王宾,王自良,等. 沙丁胺醇免疫原的合成与鉴定[J]. 河南农业科学, 2010(5): 114-116.
- [3] 毛丽莎,刘红河,陈慧玲. 液相色谱-质谱联用法测定猪肉组织中3种 β -激动剂[J]. 中国热带医学, 2009(7): 1356-1357.
- [4] 王艺熹. 沙丁胺醇兔单克隆抗体的制备及ELISA快速检测试剂盒的研制[D]. 杭州:浙江大学, 2008.
- [5] 王保玲,袁利鹏,雷红涛,等. 沙丁胺醇直接竞争ELISA法快速测定[J]. 食品科学, 2010(20): 270-274.
- [6] SHEN Suhui, OUYANG Jin, BAEYENS W R, et al. Determination of beta2-agonists by ion chromatography with direct conductivity detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38(1): 166-172.
- [7] POLETTINI A, MONTAGNA M, HOGENDOORN E A, et al. Applicability of coupled-column liquid chromatography to the analysis of beta-agonists in urine by direct sample injection: I: Development of a single-residue reversed-phase liquid chromatography-UV method for clenbuterol and selection of chromatographic conditions suitable for multi-residue analysis[J]. J Chromatogr A, 1995, 695(1): 19-31.
- [8] VANOOSTHUYZE K E I, COR J M, VAN PETEGHEM C H. Development of a fast and simple method for determination of beta-agonists in urine by extraction on empor membranes and detection by a test strip immunoassay[J]. J Agric Food Chem, 1997, 45(8): 3129-3137.
- [9] GARCIA R J, PEREZ B, CASADEMONT G. Determination of clenbuterol and salbutamol in urine by capillary gas chromatography with capillary columns of 100 microns[J]. J Chromatogr, 1993, 655(1): 73-76.
- [10] 邱阳生,杨根海,何方洋. β -兴奋剂沙丁胺醇及其检测技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2002(4): 50-52.
- [11] 姜琛璐,李林. 沙丁胺醇毒性及检测研究新进展[J]. 现代预防医学, 2013(2): 227-230.
- [12] MENG Meng, ZHANG Yulan, LU Shengxin, et al. Preparation of anti-salbutamol antibody based on a new designed immunogen and development of a heterologous indirect ELISA for detection of salbutamol residue[J]. Acta Pharm Sinica, 2010, 45(4): 442-450.
- [13] 汪慧蓉. β -兴奋剂克伦特罗、沙丁胺醇的免疫检测方法研究[D]. 西安:西北大学, 2006.
- [14] 田颖,李玉文. 兽药残留及其分析技术研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2005(12): 42-43.
- [15] 竹磊,尹红娜,陈锦辉. 动物肌肉中SAL残留快速检测新方法[J]. 食品科技, 2008(6): 206-208.
- [16] 李春生,吴萌,李君华,等. 沙丁胺醇人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(17): 122-125.
- [17] 罗芳. Folin-酚试剂法蛋白质定量测定[J]. 黔南民族师范学院学报, 2005(3): 46-47.
- [18] FIELDS R. The measurement of amino groups in proteins and peptides[J]. Biochem J, 1971, 124(3): 581-590.
- [19] EURSAKUN S, SIMSIRIWONG P, RATANABANANGK-OON K. Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid[J]. Toxicon, 2012, 60(6): 1022-1029.
- [20] 李春生. 沙丁胺醇单克隆抗体的制备及其免疫检测方法的初步建立[D]. 石家庄:河北师范大学, 2011.

【责任编辑 柴焱】