

束建花, 郭红艳, 王立琦, 等. 呋喃它酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 18-23.

呋喃它酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备

束建花, 郭红艳, 王立琦, 高艳, 曾振灵

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】建立高灵敏度的呋喃它酮酶联免疫检测方法.【方法】以戊二醛法将呋喃它酮代谢物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷酮(AMOZ)与牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)偶联,再由 NaBH_4 还原西佛碱得到结构稳定的免疫原 AMOZ-BSA 和 AMOZ-OVA;用对醛基苯甲酸(CPA)对 AMOZ 进行衍生化,得到衍生物 CPAMOZ,由质谱鉴定,经 N-羧基琥珀酰亚胺活化酯法将 CPAMOZ 与 BSA 和 OVA 偶联得到免疫原 CPAMOZ-BSA 和包被原 CPAMOZ-OVA.经紫外扫描鉴定表明人工抗原合成成功.免疫 Balb/c 小鼠,ic-ELISA 方法测定鼠血清多克隆抗体对 AMOZ 和 NPAMOZ 的特异性.【结果和结论】结果显示 CPAMOZ-BSA 免疫制备的抗体对 NPAMOZ 有良好的特异性.抗体效价为 $1:32 \times 10^4$,对 NPAMOZ 的半抑制质量浓度为 $4.53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$;抗血清与 CPAMOZ、AMOZ 及呋喃它酮的交叉反应率为 78.6%、1.5% 及 4.6%;与其他 3 种硝基呋喃类原药及其代谢物对硝基苯甲醛、对醛基苯甲酸等结构相似物的交叉反应均小于 0.01%.

关键词:呋喃它酮代谢物;半抗原;多克隆抗体;酶联免疫测定法

中图分类号:S511;S502

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2014)02-0018-06

Synthesis of artificial antigens and preparation for specific antisera against 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of furaltadone

SHU Jianhua, GUO Hongyan, WANG Liqi, GAO Yan, ZENG Zhenling

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

Abstract:【Objective】To establish a high sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of furaltadone.【Method】Furaltadone metabolite (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, AMOZ) was coupled to carrier proteins (bovine serum albumin or ovalbumin) and reduced with NaBH_4 for the production of immunogen AMOZ-BSA and coating antigen AMOZ-OVA through glutaraldehyde method. With 4-carboxybenzaldehyde for derivatization reagent, AMOZ was made into CPAMOZ, which was successfully conjugated to carrier proteins according to the active ester method to form CPAMOZ-BSA, CPAMOZ-OVA. UV scanning showed that antigens were successfully linked to carrier proteins. After immunizing animal (Balb/c mice), polyclonal antibody against NPAMOZ was produced.【Result and conclusion】Antibody was diluted at $1:32 \times 10^4$ and the IC_{50} value was $4.53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. The cross-reactivity (CR) of the antibody with CPAMOZ, AMOZ and furaltadone was 78.6%, 1.5% and 4.6% respectively. There is almost no CR with other three nitrofurans and their metabolites, which indicates a high selectivity of the antibody.

Key words: furaltadone metabolite; hapten; polyclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

收稿日期:2013-05-31 优先出版时间:2014-01-03

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0830.022.html>

作者简介:束建花(1988—),女,硕士研究生,E-mail: 386126805@qq.com;通信作者:曾振灵(1963—),男,教授,博士,
E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

基金项目:农业部兽药质量安全监管项目(农财发[2012]36号)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

呋喃它酮(Furaltadone, FTD)隶属于硝基呋喃类药物,是人工合成的含有五元呋喃环结构的广谱抗菌药,曾被广泛用于畜禽、水产或蜜蜂养殖,主要用于防治细菌感染、原虫感染、禽霍乱和火鸡黑头病等^[1]。呋喃它酮原药在体内消除半衰期短,迅速生成代谢物5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮(AMOZ),该代谢物可与组织蛋白结合形成稳定态并长期存在,因而AMOZ被用作检测呋喃它酮的残留标示物。当含代谢物的食品被人类食用后,在胃液的酸性条件下代谢物从蛋白质中水解出来被人体吸收。早在1970年和1980年,硝基呋喃类药物的诱变性就在细菌和哺乳动物细胞实验中得到证实^[2]。Franek等^[3]也通过研究指出硝基呋喃类药物对动物机体有毒害作用,并存在潜在的致畸、致癌和致突变作用,呋喃它酮具有强烈的致癌性。鉴于硝基呋喃类药物残留的严重危害,欧盟于1995年全面禁止该类药物在畜牧业使用,规定其在动物源性食品中不得检出^[4]。澳大利亚(1993)、巴西(2002)、泰国(2002)和美国(2002)等多国也已颁布对食物中应用呋喃它酮等呋喃类药物的禁令。中国农业部于2002年发布的《动物性食品中兽药最高残留限量》标准中,呋喃它酮明确被定为“在动物性食品中不得检出”的项目。

目前用于呋喃它酮残留的仪器检测方法主要有LC-MS^[5]、LC-MS/MS^[6]。尽管该类检测方法有很高的灵敏度和准确性,但所需仪器昂贵、操作复杂、耗时久,难以应用于大规模的筛选检测。相对来说,免疫检测法具有简便、快速、高灵敏和高特异性等优点,在国内外兽药、农药残留检测中得以广泛应用,尤其是ELISA法。Pimpitak等^[7]利用制备的AMOZ单克隆抗体建立了检测虾中AMOZ残留的ic-ELISA方法,以CPAMOZ为竞争物,IC₅₀值为(1.19 ± 0.03) ng · mL⁻¹。Diblikova等^[8]以直链作间隔臂合成了新型半抗原,制备的抗体对AMOZ并无抑制率,经分析半抗原分子结构不稳定、空间构象过于简单及间隔臂封闭作用都可能是导致抗体无特异性的因素。本研究旨在以CPAMOZ-BSA和AMOZ-BSA为免疫原对Balb/c小鼠进行免疫,通过ic-ELISA方法测定鼠血清多克隆特性,对结果进行比较分析,筛选出最佳的免疫原和包被原组合,为进一步制备单克隆抗体和提高动物性食品中AMOZ残留检测的ic-ELISA方法的灵敏度奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康雌性SPF级Balb/c小鼠,4~6周龄,购自广东省实验动物中心,饲养于华南农业大学国家兽

药残留基准实验室动物观察室。

1.2 试剂与药品

AMOZ由华南农业大学兽医学院药理实验室合成;戊二醛为上海凌峰化学试剂有限公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)为上海金穗生物科技有限公司产品;对醛基苯甲酸、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC · HCl)、N-羧基琥珀酸亚胺(NHS)均为阿拉丁试剂公司产品;AMOZ标准品、FTD标准品、NPAMOZ标准品、羊抗鼠IgG-HRP、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为美国Sigma公司产品。

1.3 主要仪器与设备

旋转蒸发器(上海爱朗仪器),液相色谱串联质谱联用仪(安捷伦6430),紫外/可见分光光度计(岛津公司),酶联免疫检测仪(Thermo scientific公司),离心机(Thermo scientific公司),磁力搅拌器(巩义市予华仪器厂)。

1.4 免疫原AMOZ-BSA、包被原AMOZ-OVA的制备

在安装有磁力搅拌器装置的烧杯中加入16.8 mg BSA和1 mL PBS(0.05 mol · L⁻¹, pH = 7.4),称取5.3 mg AMOZ溶于0.4 mL PBS(0.05 mol · L⁻¹, pH = 7.4),待BSA完全溶解后加入已溶解完全的AMOZ溶液,搅拌过程中将30 μL戊二醛溶液逐滴加入,反应过程中可见反应液颜色逐渐变深至青黄色,室温反应2 h后置入冰水浴中。称取25 mg NaBH₄分批加入上述反应液,约20 min后反应液颜色逐渐褪去,室温反应2 h,合成路线见图1。收集偶联后的溶液,装入相对分子质量为12 400的透析袋中,4 °C搅拌条件下用3 L PBS(0.015 mol · L⁻¹, pH = 7.4)缓冲液透析3 d,每天更换透析液2次。透析完成后,离心取上清液,得到的完全抗原分装于1 mL离心管中,冻存于-20 °C条件下备用。

包被原AMOZ-OVA偶联物的制备方法同免疫原AMOZ-BSA的制备。

1.5 免疫原CPAMOZ-BSA、包被原CPAMOZ-OVA的制备

CPAMOZ的合成与鉴定:称取100 mg AMOZ于25 mL干燥圆底烧瓶中,用3 mL甲醇溶解,搅拌升温至60 °C,再加入156 mg对醛基苯甲酸,反应3 h,反应过程中用薄层色谱法(Thin layer chromatography, TLC)跟踪反应进程[展开剂为V(乙酸乙酯):V(甲醇)=9:1]。用甲醇洗涤沉淀,烘干后得到白色粉末即为CPAMOZ。取少量CPAMOZ,用甲醇溶解,经ESI-MS质谱鉴定。

免疫原CPAMOZ-BSA的合成:取0.01 mmol的

CPAMOZ 溶解于 0.2 mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 再分别加入 0.15 mmol EDC·HCl 和 0.15 mmol NHS, 室温搅拌反应 6 h, 得溶液 a. 取 30 mg BSA 溶于 10 mL PBS (pH = 7.4, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 得溶

液 b. $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 搅拌, 将溶液 a 逐滴加入溶液 b 中, 反应过夜, 合成路线见图 2. 透析方法同 1.4.

包被原 CPAMOZ-OVA 偶联物的制备方法同免疫原 CPAMOZ-BSA 的制备.

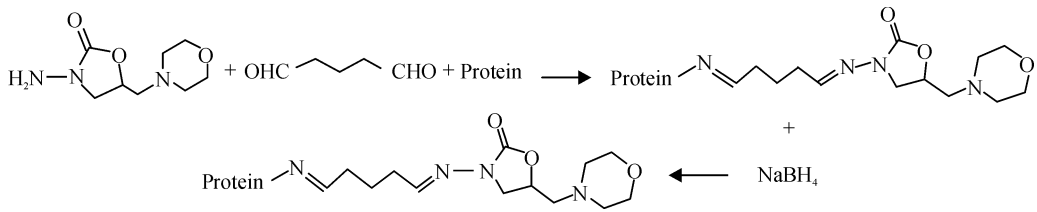


图 1 以 AMOZ 作半抗原合成人工抗原的路线图

Fig. 1 The synthesized scheme of artificial antigens for AMOZ

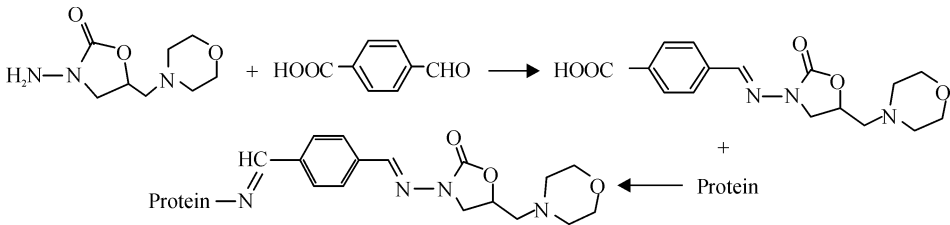


图 2 以 CPAMOZ 作半抗原合成人工抗原的路线图

Fig. 2 The synthesized scheme of artificial antigens for CPAMOZ

1.6 免疫原的鉴定

在 200 ~ 400 nm 紫外光区对等浓度的 AMOZ-BSA 和 CPAMOZ-BSA 溶液、BSA 溶液、AMOZ 和 CPAMOZ 溶液进行光谱扫描, 并测定完全抗原载体蛋白和半抗原最大吸收波长处的吸光度, 比较特征吸收峰与吸收曲线, 初步鉴定人工抗原是否偶联成功.

1.7 动物免疫试验与抗体测定

1.7.1 动物免疫试验 取 6 只 5 ~ 6 周龄的雌性 Balb/c 小鼠随机均分为 2 组, 编号 I 和 II 组, 分别免疫 CPAMOZ-BSA 和 AMOZ-BSA, 免疫剂量 50 $\mu\text{g}/\text{只}$ (以蛋白质量计算). 首免: 免疫原稀释至 1 mg/mL, 与 100 μL 弗氏完全佐剂等量混合 (体积比 1:1), 充分乳化, Balb/c 小鼠背部皮下 4 点注射; 每隔 14 d 加强免疫 1 次, 将弗氏完全佐剂换成弗氏不完全佐剂, 其余操作同首免. 第 4 次加强免疫 7 d 后, 取鼠尾血在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下 12 000 r/min 离心 5 min 后收集尾血清, 用 ELISA 和 ic-ELISA 检测尾血清效价及对 AMOZ 和 NPAMOZ 的抑制率.

1.7.2 多克隆抗体效价测定 采用 ELISA 测定血清效价, 抗血清 $D_{450 \text{ nm}}$ (P) 与相同稀释度阴性对照血清 $D_{450 \text{ nm}}$ (N) 之比 $P/N > 2$ 且 $P > 1.0$ 的最大稀释度为抗 AMOZ 的多克隆抗体的效价. 取 $D_{450 \text{ nm}}$ 为 1.0 左右的抗体稀释度进行 ic-ELISA 试验, 测定多克隆抗体灵敏度.

1.7.3 多克隆抗体灵敏度测定 以 CPAMOZ-OVA

和 AMOZ-OVA 为包被原做 ic-ELISA 鉴定多克隆抗体特异性. 分别以 100.000、10.000、5.000、1.000、0.500、0.100、0.010、0.001 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 AMOZ、NPAMOZ 标准溶液和包被抗原竞争与多克隆抗体结合反应. 以相应浓度竞争物抑制时的 $D_{450 \text{ nm}}$ (B) 与无竞争物抑制时的 $D_{450 \text{ nm}}$ (B_0) 的比值 (B/B_0) 为纵坐标, 以标准品不同质量浓度为横坐标, 运用四参数法拟合曲线, 推导出回归方程, 根据回归方程式计算出 NPAMOZ 的 IC_{50} , 同时比较不同抗体特异性的高低.

1.7.4 交叉反应测定 用梯度稀释的呋喃唑酮、呋喃唑酮代谢物 (AOZ)、呋喃西林、呋喃西林代谢物 (SEM)、呋喃妥因、呋喃妥因代谢物 (AHD)、对硝基苯甲醛、对羧基苯甲醛作为抑制物, 用 ic-ELISA 测定各抑制物在不同浓度的 $D_{450 \text{ nm}}$, 分别作抑制曲线, 根据拟合曲线计算各药物的 IC_{50} , 然后按照公式计算交叉反应率 (CR): $\text{CR} = (\text{NPAMOZ 的 } \text{IC}_{50} / \text{其他抑制物的 } \text{IC}_{50}) \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 CPAMOZ 的鉴定

CPAMOZ 的质谱图见图 3, 其理论相对分子质量为 333.1, 从质谱图分析 CPAMOZ 的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 为 334.2, CPAMOZ 的 $[\text{M} - \text{COOH} + \text{H} + \text{H}]^+$ 为 290.2, 都与理论相对分子质量相符合. 结果表明 CPAMOZ 合成成功.

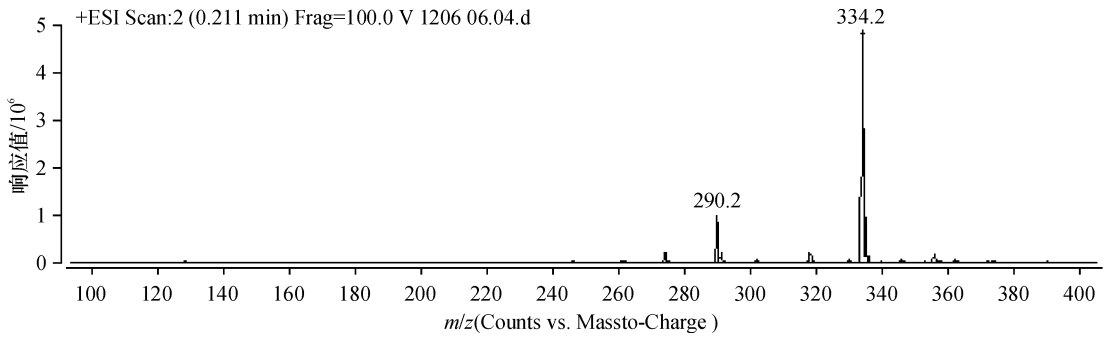


图3 半抗原 CPAMOZ 的质谱图

Fig. 3 The mass spectrum of CPAMOZ

2.2 免疫原的鉴定

由紫外分光光度法鉴定免疫原的合成是否成功. CPAMOZ-BSA 的紫外图谱见图 4, 由于 CPAMOZ 结构中含有苯环, 在紫外区(波长 200 ~ 400 nm)有一定吸收峰, 图 4 中 CPAMOZ 在 291.5 nm 处有最大吸收峰. 当它连接到蛋白质载体上时, 载体蛋白的紫外吸收特征将发生改变. 因此, 图 4 中载体蛋白 BSA 在 278 nm 处有最大吸收峰, 而免疫原 CPAMOZ-BSA 的最大吸收峰在 290.5 nm 处, 表明偶联后吸收峰发生了漂移, 初步判断 CPAMOZ-BSA 偶联成功. AMOZ-BSA 的紫外图谱见图 5, 由于 AMOZ 分子中无苯环, 因此在紫外区(波长 200 ~ 400 nm)的吸收峰较为平坦, 但 AMOZ 与 BSA 通过戊二醛法偶联生成了西佛碱结构, 从而偶联物 AMOZ-BSA(未还原)在 265 nm 处有明显吸收峰, 但西佛碱结构被 NaBH₄ 还原成碳氮单键后在紫外区的吸收峰大大降低, AMOZ-BSA(还原)峰形与 BSA 的相似(图 5), 在 277 nm 处有最大吸收峰, 由此进一步证明了还原成功.

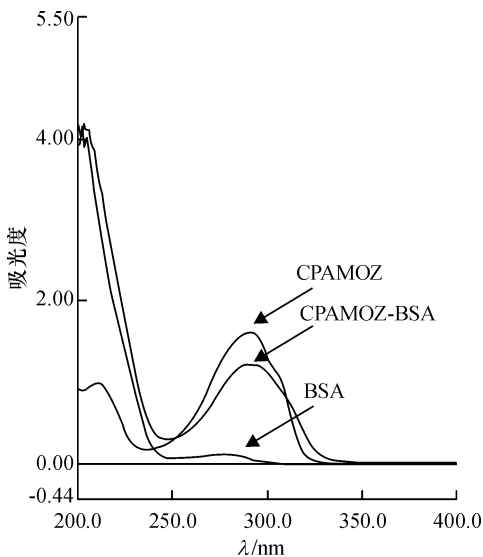


图4 CPAMOZ-BSA 紫外扫描图谱

Fig. 4 Ultraviolet scanning of CPAMOZ-BSA

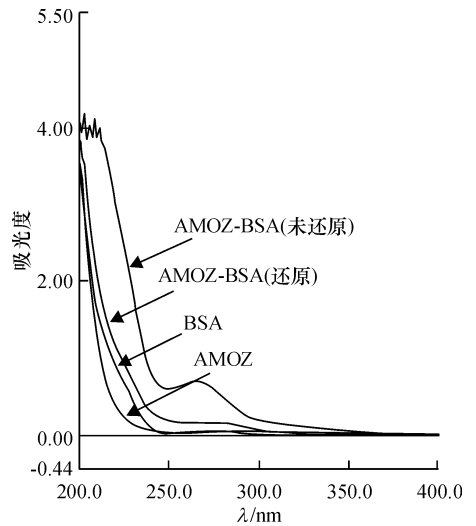


图5 AMOZ-BSA 紫外扫描图谱

Fig. 5 Ultraviolet scanning of AMOZ-BSA

2.3 抗体特异性的测定

2.3.1 效价测定 取 4 只免后的小鼠血清, 分别用相应的包被原做 ELISA 试验, 测定不同稀释度小鼠血清的 D_{450 nm}, 结果见图 6. 免疫原 CPAMOZ-BSA 和 AMOZ-BSA

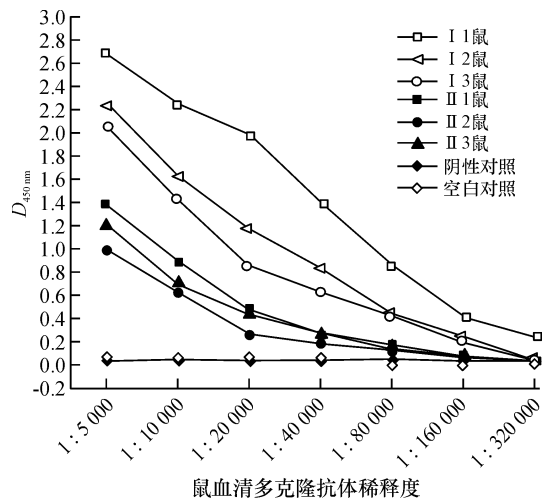


图6 ELISA 测定 I、II 组小鼠血清多克隆抗体效价

Fig. 6 Determination of the duliton of polyclonal antibodies from group I and group II by ELISA method

可诱导I组、II组小鼠产生抗体,其中I组的血清抗体效价比较高,均达到 $1:16 \times 10^4$ 以上,最高的达 $1:32 \times 10^4$ 以上;II组的血清效价则普遍相对较低,仅达到 $1:4 \times 10^4$ 以上. 以上现象可能是由于 CPAM-OZ-BSA 间隔臂中的苯环结构是强势基团,可刺激机体产生较强的免疫应答反应,因此产生的抗体效价普遍较高. 同理,由于 AMOZ-BSA 间隔臂是碳直链,对机体影响较小,因此诱导产生的抗体效价偏低.

2.3.2 灵敏度测定 将2种鼠血清多克隆抗体与合成的2种包被原进行配对组合,以 AMOZ、NPAM-OZ 为竞争物,用 ic-ELISA 法测定不同组合 IC_{50} , 结果(表1)可见,以 AMOZ 作为竞争物时,4种组合对 AMOZ 的 $IC_{50} > 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 无明显抑制. 以 NPAM-OZ 为竞争物时,AMOZ-BSA 诱导产生的 II 组抗体对 NPAM-OZ 的 $IC_{50} > 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 也无明显抑制;而 CPAM-OZ-BSA 诱导产生的 I 组抗体,与同源性包被原 CPAM-OZ-OVA 组合配对时, $IC_{50} = 11.49 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 与异源性包被原 AMOZ-OVA 组合配对时, $IC_{50} = 4.53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 灵敏度明显提高. 分析对比试验结果表明:1) AMOZ 作半抗原时相对分子质量太小且结构简单,制备的免疫原 AMOZ-BSA 无法诱导机体产生针对 AMOZ 的高特异性抗体;2) CPAM-OZ 作半抗原时,由于其结构中含有强势基团苯环且 CPAM-OZ 与 NPAM-OZ 结构相似,因此刺激机体产生的抗体对 NPAM-OZ 同样具有特异性;3) I 组抗体与不同包被原组合的 ic-ELISA 标准曲线(图7)表明,抗体与异源性的包被原配对,能使灵敏度得到较程度的提升,这可能是由于 CPAM-OZ-BSA 诱导产生的抗体对 NPAM-OZ 识别度比 AMOZ 高,因此以 NPAM-OZ 为竞争物、AMOZ-OVA 为包被原时, NPAM-OZ 的竞争能力提高,从而 IC_{50} 降低,灵敏度提高.

表1 ic-ELISA 对抗体特异性的测定

Tab.1 Determination of antibody specificity

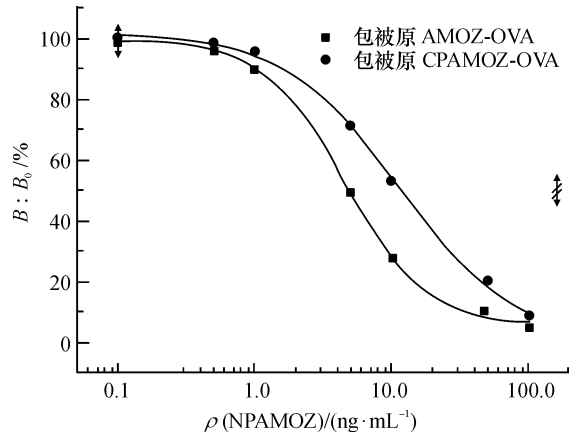
| 竞争物 | 抗血清组别 | $IC_{50}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | |
|---------|-------|--|----------|
| | | CPAM-OZ-OVA | AMOZ-OVA |
| AMOZ | I | N ¹⁾ | N |
| | II | N | N |
| NPAM-OZ | I | 11.49 | 4.53 |
| | II | N | N |

1) N: 表示无明显抑制作用, $IC_{50} > 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.4 交叉反应率测定

以包被原 AMOZ-OVA 为基础,采用 ic-ELISA 方法测定抗体特异性. 结果(表2)可见,抗体与 CPAM-OZ、AMOZ、FTD 等有交叉反应,交叉反应率分别为 78.6%、1.5% 和 4.6%, 与其他结构相近的药物及其

代谢物等基本无交叉反应.



B_0 为无竞争物抑制时的 $D_{450 \text{ nm}}$, B 为相应浓度竞争物抑制时的 $D_{450 \text{ nm}}$.

图7 多克隆抗体与不同包被原组合的 ic-ELISA 标准曲线
Fig.7 The standard curves of ic-ELISA about different antibody/coat antigen combinations

表2 抗体与其他药物的交叉反应

Tab.2 Cross-reactivity of antibody and other drugs

| 竞争药物 | $IC_{50}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ | CR/% | |
|---------|--|------------|--------|
| 硝基咪唑类药物 | NPAM-OZ | 4.53 | 100.00 |
| | CPAM-OZ | 5.76 | 78.60 |
| | AMOZ | 300.20 | 1.50 |
| | FTD | 98.40 | 4.60 |
| | AOZ,AHD,SEM | >10 000.00 | <0.01 |
| 衍生化试剂 | FZD,NFT,NFZ | >10 000.00 | <0.01 |
| | 对硝基苯甲醛 | >10 000.00 | <0.01 |
| | 对羧基苯甲醛 | >10 000.00 | <0.01 |

3 讨论与结论

AMOZ 的相对分子质量仅为 201,属于小分子化合物,只具有反应原性而不具有免疫原性,因此必须与大分子载体物质偶联. 本研究为探讨 AMOZ 分子直接与载体蛋白 BSA 偶联是否可诱导动物机体产生针对 AMOZ 的特异性抗体,将 AMOZ 与 BSA 通过戊二醛法偶联,虽然戊二醛法较为常见^[9-10],但其生成物的间隔臂较长且含有西佛碱结构,结构稳定性较差,本文通过 NaHB_4 将西佛碱结构还原使生成物转变成更稳定的免疫原 AMOZ-BSA. 另外,又以 AMOZ 与对醛基苯甲酸反应合成 CPAM-OZ,通过活性酯法将 CPAM-OZ 与 BSA 偶联得免疫原 CPAM-OZ-BSA^[11]. 免疫原 AMOZ-BSA 与 CPAM-OZ-BSA 的结构区别主要在于间隔臂的立体结构是否复杂. 本试验采用 2 种包被原通过 ic-ELISA 方法对 2 种免疫原诱导产生

的抗体的特性进行测定,对比两者结果发现,以 AMOZ 为竞争物时,无论采用同源性或者异源性包被方式,ic-ELISA 的 $IC_{50} > 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,远远达不到中国零残留检测的要求和欧盟的要求^[12]。据分析导致抑制率差是由于 AMOZ 相对分子质量太小且立体结构不够复杂,无法刺激动物机体产生对 AMOZ 有高特异性的抗体。然而 CPAMOZ-BSA 结构中含有苯环较为复杂,可诱导机体产生对 NPAMOZ 的特异性抗体,并且通过与异源性包被原 AMOZ-BSA 配对,测得 I 组鼠血清多克隆抗体效价为 $1:32 \times 10^4$, $IC_{50} = 4.53 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,灵敏度比同源性配对法高 2 倍多,表明抗原抗体的异源性配对能提高 ELISA 方法的灵敏度,这与已有的文献^[13]报道相符。从而为其单克隆抗体的制备和 ic-ELISA 方法灵敏度的提高建立了良好的基础,并且这也为环境、食品中残留农药的快速检测提供一定的参考。

参考文献:

- [1] DRAISCI R, GIANNETTI L, LUCENTINI L, et al. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 777(1): 201-211.
- [2] McCALLA D R, REUVERS A, KAISER C. Breakage of bacterial DNA by nitrofurans derivatives[J]. *Cancer Res*, 1971, 31(12): 2184-2188.
- [3] FRANEK M, DIBLIKOVA I, CERNOCH I, et al. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: Immunochemical strategy for generic antibodies and competitors[J]. *Anal Chem*, 2006, 78(5): 1559-1567.
- [4] European Commission(EC). Commission regulation (EC) 1442/95 of 26 June 1995 :Amending annexes I, II, III and IV of council regulation (EEC) No 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin[J]. *Official J Europ Commun*, 1995, 143: 26-30.
- [5] LEITNER A, ZÖLLNER P, LINDNER W. Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 939(1/2): 49-58.
- [6] XIA Xi, LI Xiaowei, ZHANG Suxia, et al. Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1208(1/2): 101-108.
- [7] PIMPITAK U, PUTONG S, KOMOLPIS K, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples[J]. *Food Chem*, 2009, 116(3): 785-791.
- [8] DIBLIKOVA I, COOPER K M, KENNEDY D G, et al. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurans metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 540(2): 285-292.
- [9] 奚茜,李沐洁,龚云飞,等. 链霉素人工抗原及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *食品科学*,2013(5): 181-185.
- [10] 赵朋玲,郑海涛,姜盼盼,等. 两种方法制备氟苯尼考人工抗原及其鉴定[J]. *食品科学*,2010(15): 225-230.
- [11] SONG Juan, YANG Hong, WANG Yuzhen, et al. Direct detection of 3-amino-5-methylmorpholino- 2-oxazolidinone (AMOZ) in food samples without derivatisation step by a sensitive and specific monoclonal antibody based ELISA [J]. *Food Chem*, 2012, 135(3): 1330-1336.
- [12] European Commission (EC). Commission decision 2003/181/EC of 13 March 2003: Amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin[J]. *Official J Europ Commun*, 2003, L71: 17-18.
- [13] XU Zhenlin, SHEN Yudong, SUN Yuanming, et al. Novel hapten synthesis for antibody production and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of furaltadone metabolite 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ)[J]. *Talanta*, 2013, 103: 306-313.

【责任编辑 柴 焯】