

氧氟沙星完全抗原的合成鉴定及其 单克隆抗体的制备纯化

于海峰¹, 张 森¹, 万忠海², 李晓艳², 谭建华^{2,*}

(1. 吉林大学农学部畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062;

2. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林 长春 130062)

摘 要: 本试验通过碳二亚胺(EDC)法把氧氟沙星(OFLX)与载体蛋白BSA和OVA分别进行偶联制备免疫抗原和包被抗原, 并采用紫外扫描法和SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳方法对合成抗原进行了鉴定。通过杂交瘤常规技术获得了抗OFLX的单克隆抗体杂交瘤细胞株7株, 用辛酸-硫酸铵法对腹水进行了纯化。纯化腹水均属IgG₁型。经过ELISA方法鉴定, 纯化后的抗体效价>1:128000; 交叉实验证明所得抗体与达氟沙星、洛美沙星、环丙沙星、诺氟沙星、卡那霉素、庆大霉素、泰乐菌素均没有交叉反应, 表现了良好的敏感性和特异性。

关键词: 氧氟沙星; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验;

Synthesis and Identification of the Antigen of OFLX and the Production and Purification of Its Monoclonal Antibodies

YU Hai-feng¹, ZHANG Sen¹, WAN Zhong-hai², LI Xi-ao-yan², TAN Jian-hua^{2,*}

(1. College of Animal Science and Technology, Division of Agriculture, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Veterinary Research Institute, Changchun 130062, China)

Abstract: The Ofloxacin(OFLX) is coupled to BSA as an immunogen and to OVA as a coating antigen using the coupling agent EDC. The immunogen and coating antigen have been identified by the method of ultraviolet scanner and SDS-PAGE. Monoclonal antibodies hybridoma cell against OFLX 7 strain have been gained and ascites have been purified by using a caprylic acid/ammonium sulfate precipitation (CA-AS). Subclass of purified ascites was IgG₁. Valency of antibody purified is higher than 1:128000, and the antibody wasn't cross-reactivity with Danofloxacin, Lomefloxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Kanamycin, Gentamicin, Tylosin by ELISA. And the purified monoclonal antibody against OFLX shows a very high degree of sensitivity and specificity.

Key words: Ofloxacin; monoclonal antibodies; ELISA

中图分类号: 0812

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)10-0223-06

氧氟沙星(Ofloxacin, OFLX)是第三代喹诺酮类药物, 又名氟嗟酸, 是由日本第一制药株式会社于1980年开发的一种抗生素, 因为分子的基本结构中引入了疏水性的氟原子及亲水性的恶嗪环, 使其抗菌活性得到了增强, 与早期喹诺酮类药物相比, 其细菌耐药性也大大降低了^[1]。正因如此, 氧氟沙星经常被作为饲料添加剂或防治疾病的兽药使用。目前由于我国畜牧市场的混乱, 抗菌药物使用混乱, 严重的影响我国畜产品的质

量。我国农业部对氧氟沙星的停药期做出了明确规定, 其注射液停药期为28d, 弃奶期7d, 产蛋鸡禁用; 其溶液停药期为28d, 产蛋鸡禁用。目前国际上常用的氧氟沙星药残的检测方法主要高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)和气相色谱-质谱联用法(GC-MS)等。这些方法虽然灵敏、准确, 但检测时间长、耗资大、对人员素质要求高, 不适合用来对大批量样品测定, 不适应快速、简便的市场监测要求。因此, 本实验联合单

收稿日期: 2006-06-29

*通讯作者

作者简介: 于海峰(1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事动物性食品安全性研究。

克隆抗体和 ELISA 技术, 建立一种精确、简单、快速氧氟沙星药物残留的检测方法以适应市场的要求。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及瘤细胞

8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(长春生物制品所提供); SP2/0 细胞(由本室保存)。

1.1.2 试剂

氧氟沙星标准品(98.4%)、盐酸环丙沙星标准品(99.7%)、盐酸洛美沙星标准品(99.8%)、乳酸诺氟沙星标准品(99.6%)、甲磺酸达氟沙星标准品(99.7%)、泰乐菌素(1015IU/mg)、卡那霉素(775IU/mg)、庆大霉素(546IU/ml) 中国兽医药品监察所; 碳二亚胺(EDC)、卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、N- 羧基琥珀酰亚胺(NHS)、HT(50 ×)、HAT(50 ×)、50%PEG、邻苯二胺(OPD)、抗体亚型鉴定试剂盒(Sigma); HRP 酶标羊抗小鼠 IgG 北京中杉生物公司。

1.1.3 仪器

BECKMAN DU-640 核酸蛋白分析仪(USA); PALL 不锈钢板式滤器(USA); PALL PL5241 超纯水仪(USA); 自动凝胶成像仪(EEC); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方 法

1.2.1 免疫抗原和包被抗原的制备^[2,3]

准确称取 N- 羧基琥珀酰亚胺(NHS)2.88mg、碳二亚胺(EDC)10.23mg、氧氟沙星(OFLX)3.86mg、加入 230ul 的 N,N- 二甲基甲酰胺(DMF)。此溶液称为溶液 A。溶液 A 室温, 搅拌, 遮光, 孵育 24 h。

准确称取牛血清白蛋白(BSA)26.4mg, 加入 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)1.72ml。此溶液称为溶液 B。将孵育好的溶液 A 逐滴加入溶液 B 中, 边加边搅拌。室温搅拌 3 h。

反应结束后, 在 4℃ 冰箱中用 0.01mol/L pH7.4 PBS 透析 6d, 每天换液 3 次。最后将透析后的溶液(OFLX-BSA)定容 3ml, 分装 -20℃ 保存。

同法合成包被抗原氧氟沙星-卵清蛋白(OFLX-OVA)。

1.2 偶联抗原的鉴定

1.2.1 紫外波长扫描法^[4]

用 PBS(0.01mol/L, pH7.4)稀释 OFLX、BSA、OVA 和两种偶联物: OFLX-BSA 和 OFLX-OVA, 配置成一定浓度的溶液(使浓度保持一致), 然后用 BECKMAN DU-640 核酸蛋白分析仪进行紫外扫描, 得到它们的紫外

吸收光谱图。

再根据原理: 偶联产物中 A、B 两种分子偶联前均有各自的最大吸收峰, 其在最大吸收峰波长处的吸光值分别为 AA_{am}、AB_{bm}。但偶联产物在 A、B 两种分子最大吸收峰波长处的吸光值 AC_{am}、AB_{bm} 均为在此波长处两种分子自身吸光值的叠加:

$$AC_{am} = KA_{am} \times Ca \times L + KB_{am} \times Cb \times L \quad (1)$$

$$AC_{bm} = KB_{am} \times Cb \times L + KA_{bm} \times Ca \times L \quad (2)$$

两式相除, 经变换得

$$Ca/Cb = (AC_{am} \times KB_{bm} - AC_{bm} \times KB_{am}) / (AC_{bm} \times KA_{am} - AC_{am} \times KA_{bm}) \quad (3)$$

Ca/Cb 即为偶联产物中 A、B 两种物质的分子结合比。

1.2.2 SDS-聚丙烯酰胺电泳法^[5]

BSA、OVA、OFLX-BSA 和 OFLX-OVA 均用 0.01mol/L pH7.4 PBS 稀释到适当浓度。浓缩胶浓度为 5%、分离胶浓度为 10%、电极缓冲液为甘氨酸。以 60V 电压恒压, 待溴酚蓝进入分离胶后, 电压调到 120V。电泳完毕后固定液固定 30min, 考马斯亮蓝 R-250 染色剂染色过夜, 脱色液脱色至背景清晰为止。蛋白电泳图通过凝胶成像仪成像并且进行分析。

1.2.3 单克隆抗体的制备

1.2.3.1 动物免疫

取 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠(体重 14~16g)首免采用 OFLX-BSA 与等量福氏完全佐剂混合, 注射器互推法乳化完全后腹腔注射, 剂量为 100 μg/只左右。3 周后进行二免, 以后每隔两周加强免疫一次, 换用福氏不完全佐剂, 其余同前。三免后, 小鼠断尾采血, 用间接 ELISA 方法检测血清效价, 直至血清效价达到 1:8000 以上。融合前 3 d, 不加佐剂, 进行强化免疫。

1.2.3.2 细胞融合

免疫脾细胞与 SP2/0 细胞按 10:1 比例在 50% PEG-1000 作用下进行细胞融合, 用 HT 培养液悬浮再分种于前一天已制备好培养层细胞的 4 块 96 孔细胞培养板中, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 24 h 后补加 HAT 培养液。

1.2.3.3 杂交瘤细胞的筛选及克隆化

融合后 4d 用 HAT 培养液对细胞进行换液, 一周左右观察孔内细胞长至 1/2 视野(100 倍镜下观察), 取上清液采用间接 ELISA 法来筛选特异性抗体: 首先用 OFLX-OVA 包被酶标板每孔 100 μl (浓度为 4 μg/ml), 放 4℃ 冰箱中孵育过夜, 1% 明胶每孔 100 μl, 37℃ 封闭 1h, 加被检上清液每孔 100 μl, 同时做空白对照和用 SP2/0 细胞上清做阴性对照。加羊抗鼠酶标二抗(HRP-IgG 1:10000 稀释), 37℃ 温箱中孵育 1h 后洗板, 加 OPD 底物溶液显色。用酶标仪 OD₄₉₀ 读值, 进行数据分析。选取阳

性孔最强效果最明显的孔采用有限稀释法对细胞进行克隆化。

1.2.3.4 融合细胞的染色体鉴定^[6]

细胞于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48h。弃原液，用 10% 胎牛血清 1640 培养基(FBS-1640)，调整至细胞浓度为 1×10^5 个/ml，体积 10ml 左右。加入 10 μg/ml 的秋水仙素，使终浓度为 0.1 μg/ml，继续培养 3h。将细胞吹打均匀，移入离心管，1000r/min 离心 8min，吸去上清液，留下约 2ml。立即加入 37 ℃ 预热的 8ml 0.5% KCl 低渗液，混匀，与 37 ℃ 温箱中静置 20min。加入新配置的固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)1ml，边滴加边摇晃，混匀后，1000r/min 离心 8min，去上清留底层细胞。再沿管壁缓缓加入固定液 5ml，混匀，于 37 ℃ 温箱中静置 30min。1000r/min 离心 8min，去上清留底层细胞。加 0.5ml 固定液，吹打制成细胞悬液。取冰冻洁净的载玻片，每片滴加细胞悬液 1~2 滴，立即吹散，在酒精灯上通过几次，使细胞平铺于载玻片上，于空气中干燥。用新配制的吉姆萨染液(吉姆萨原液 10 倍稀释)染色 10min，自来水冲洗后晾干。观察其染色体条数。

1.2.3.5 单抗的大量制备

取 4 只健康雌性的 BALB/c 小鼠，腹腔注射液体石蜡每只 0.5ml，7~14d 后，每只小鼠腹腔注射 2×10^6 个杂交瘤细胞，7~10d 后，无菌采集腹水，并用间接 ELISA 测定其效价。

1.2.4 抗体的纯化^[7]

获得的腹水先通过离心法去脂：腹水 6000 × g 离心 10min，收取上层液体，弃沉淀，然后放入 4 ℃ 冰箱中 2h，12000 × g 离心 15min，吸弃表层油脂，上清备用。再通过辛酸-硫酸铵法纯化：腹水上清加入 4 倍体积的 0.06mol/L，pH4.0 的醋酸缓冲液，用 0.1mol/L NaOH 调节 pH 至 4.8，辛酸逐滴加入混合溶液中，边加边搅拌，加完后继续搅拌 30min (均在 4 ℃ 下进行)，10000 × g 离心 30min，去沉淀。取上清加入 1/10 体积的 0.1mol/L PBS，用 1mol/L NaOH 小心调节 pH 至 7.4。冷却至 4 ℃，每 ml 加硫酸铵 0.277g，搅拌 30min，5000 × g 离心 15min。弃上清，将沉淀溶于少量 0.01mol/L PBS 中。对 0.01mol/L PBS 4 ℃，透析过夜。4 ℃，5000 × g 离心 20min，去除不溶性沉淀，-20 ℃ 保存。

1.2.5 抗体纯化的鉴定

1.2.5.1 抗体纯化 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定

纯化后的腹水和未纯化的腹水均用 0.01mol/L pH7.4 PBS 稀释到适当浓度。浓缩胶浓度为 5%、分离胶浓度为 10%、电极缓冲液为甘氨酸。以 60V 电压恒压，待溴酚蓝进入分离胶后，电压调到 120V。电泳完毕后固定液固定 30min，考马斯亮蓝 R-250 染色剂染色过夜，

脱色液脱色至背景清晰为止。蛋白电泳图通过凝胶成像仪成像并且进行分析。

1.2.5.2 抗体纯化效价鉴定

首先用 OFLX-OVA 包被酶标板每孔 100 μl (浓度为 1 μg/ml)，放 4 ℃ 冰箱中孵育过夜，1% 明胶每孔 100 μl，37 ℃ 封闭 1h，加纯化后的样品 1:1000 开始梯度稀释，稀释因子 2，每孔 100 μl，同时做未纯化的腹水和空白对照。1h 后洗板 3 次加羊抗鼠酶标二抗(HRP-IgG 1:10000 稀释)，37 ℃ 温箱中孵育 1h 后洗板，加 OPD 底物溶液显色。终止后酶标仪 490nm 读值。

1.2.6 抗体的特异性检测

为了检测所得抗体是否对 OFLX 有较强的特异性，采用间接竞争 ELISA 法，在最适工作浓度的抗体中采用板外竞争的方法加入倍比稀释的 OFLX 标准液，观察各孔的 OD 值的变化。基本步骤与非间接竞争 ELISA 方法基本一致，不同之处在于加样：配制浓度为 8 μg/ml 的 OFLX 溶液，进行倍比稀释，50 μl OFLX 抗体以 1/2 工作浓度加等体积倍比稀释的 OFLX 标准溶液先在 37 ℃ 孵育 1h，同时以 50 μl 的抗体和等体积 PBS 混合物作为标准，以 PBS 作为空白对照，然后再加到酶标板上进行反应，每孔 100 μl，37 ℃ 孵育 1h。

1.2.7 抗体的交叉反应性检测

方法同上，但抗体抑制物分别采用被比稀释的甲磺酸达氟沙星、盐酸洛美沙星、盐酸环丙沙星、乳酸诺氟沙星、庆大霉素、卡那霉素、泰乐菌素计算各竞争物的 IC₅₀，比较抗体对它们的亲合性。同时，用下式计算各竞争物与抗体的交叉反应性。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的合成

因氧氟沙星分子中含有羧基，可通过中间物 NHS 并在 EDC 等有机溶剂的作用下与蛋白质的氨基结合，形成蛋白质与小分子的偶联物：OFLX-BSA、OFLX-OVA。

2.1.1 紫外扫描图谱鉴定合成抗原

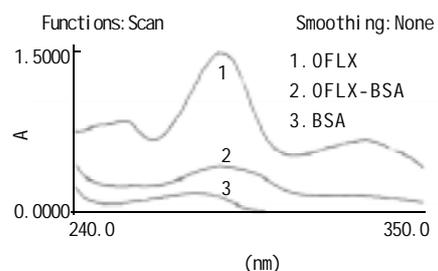


图1 OFLX、BSA 和 OFLX-BSA 紫外扫描图谱

Fig.1 The ultraviolet absorbance spectral curve of OFLX, BSA and OFLX-BSA

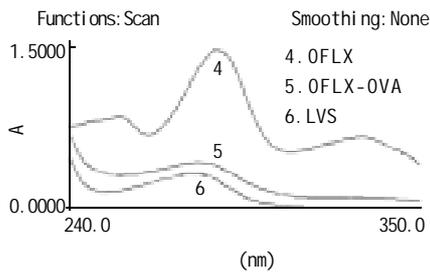


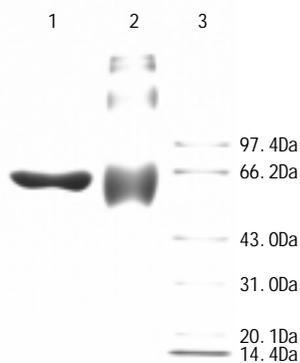
图2 OFLX、OVA 和 OFLX-OVA 紫外扫描图谱

Fig.2 The ultraviolet absorb spectral curve of OFLX, OVA and OFLX-OVA

将各溶液稀释至 200 μg/ml (偶联产物按蛋白计), 经紫外扫描得各溶液得紫外吸收光谱见图 1、2, 从图中可见 BSA、OFLX、OFLX-BSA 三者的紫外吸收光谱均有明显的差异(OVA 类同)。通过扫描测得 BSA 的最大吸收波长为 278nm, OVA 的最大吸收波长为 278.5nm, OFLX 的最大吸收波长为 286.5nm。从扫描数据中分别找出 BSA、OFLX 和 OFLX-BSA 在 278nm 和 286.5nm 的吸光值; 再查出 OVA、OFLX 和 OFLX-OVA 在 278.5nm 和 286.5nm 下吸光值。两组数据带入公式: $Ca/Cb = (AC_{am} \times KB_{bm} - AC_{bm} \times KB_{am}) / (AC_{bm} \times KA_{am} - AC_{am} \times KA_{bm})$ 便可算出 OFLX-BSA 的偶联率为 2, OFLX-OVA 的偶联率为 3。

2.1.2 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定合成抗原

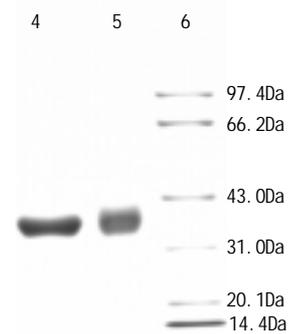
从图 3、4 中可以看出, 两个合成抗原 OFLX-BSA 和 OFLX-OVA 的蛋白条带在相应位置均出现了不同程度的弥散状态。这说明每个载体蛋白质分子和小分子物质结合的分子数目是不一致的, 紫外扫描法计算的只是每个载体蛋白质结合小分子的平均数目。图 3 中条带 2 出现了多条带, 从分子量大小来看可能是因为形成了部分 BSA 二聚体的缘故, 使得偶联率较低。因此, 非变性 SDS-PAGE 法不仅能够非常直观的看到连接上不同数目小



1. BSA ; 2. OFLX-BSA ; 3. 低分子量蛋白 Mark。

图3 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 The nondenaturing polyacrylamide gels electrophoresis



4. OVA ; 5. OFLX-OVA ; 6. 低分子量蛋白 Mark。

图4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.4 The nondenaturing polyacrylamide gels electrophoresis

分子物质的载体分子的区间分布情况, 还能够粗略地计算合成抗原地大致浓度。

2.2 单克隆抗体鉴定

2.2.1 细胞融合与杂交瘤细胞地筛选

本试验只进行了一次融合, 融合率为 99.5% (382/384), 阳性率为 46% (57/124)。最后得到 7 株单抗细胞株, 从中挑选一株较好的做如下试验。

2.2.2 染色体鉴定

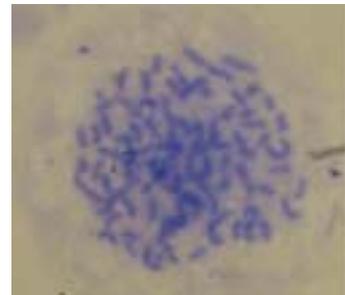


图5-1 杂交瘤细胞染色体众数

Fig.5-1 The quantity of chromatosome of hybridoma

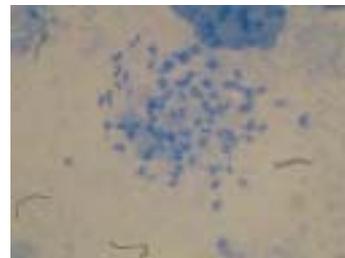


图5-2 杂交瘤细胞染色体众数

Fig.5-2 The quantity of chromatosome of hybridoma

SP2/0 细胞染色体条数为 62, 脾细胞染色体条数为 40, 杂交瘤细胞株染色体众数为 90 ~ 100 之间。分别大于亲本细胞, 并可以见到中部和亚中部着丝点的骨髓瘤细胞的标志染色体。说明细胞株确为 SP2/0 与脾细胞融合而产生的。

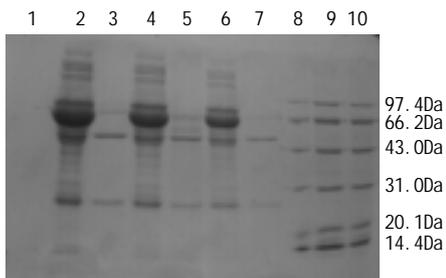
2.2.3 腹水效价测定

非间接竞争性 ELISA 法测定腹水效价均 > 1:128000。

2.2.4 单抗亚型鉴定

通过亚型鉴定试剂盒鉴定所得的单克隆抗体的亚型均为 IgG₁ 型。

2.2.5 单克隆抗体纯化前后变性 SDS-PAGE 比较及分子量测定



1. 空; 2. 1.5µl 腹水; 3. 1.5µl 纯化腹水; 4. 1µl 腹水; 5. 1µl 纯化腹水; 6. 0.5µl 腹水; 7. 0.5µl 纯化腹水; 8-10. Mark。

图6 腹水抗体 SDS-PAGE 图
Fig.6 The SDS-PAGE gels electrophoresis of ascites

2.2.6 纯化抗体效价检测

OFLX-OVA 包被, 浓度 1µg/ml。加样的抗体浓度及 OD 值结果见表 1。

从表 1 可以看出, 纯化前后抗体效价基本上保持一致。说明抗体纯化成功。

2.2.7 纯化后的抗体蛋白浓度

纯化后抗体通过 BECKMAN DU-640 核酸蛋白分析仪测得蛋白浓度为 1.5120mg/ml。

2.2.8 抗体特异性的检测

从间接竞争 ELISA 试验结果观察, 以没有加入游离抗原, 只加入抗体的孔作为对照, 可见加入游离抗原的孔 OD 值明显有所改变, 而阴性对照没有明显改变。说明抗体是针对 OFLX 的抗体。

将抗 OFLX 抗体与几种其他药物进行交叉反应性检测, 结果表明, 抗 OFLX 抗体与达氟沙星、洛美沙星、环丙沙星、诺氟沙星、卡那霉素、庆大霉素、泰乐菌素均没有交叉反应。

3 讨论

氧氟沙星属于小分子物质 (分子量 < 1000Da) 是半抗

原, 没有免疫原性, 所以必须与载体蛋白偶联成为完全抗原才具有免疫原性。自从 Landsteiner 创造性的利用半抗原制备人工合成抗原以来, 许多半抗原都通过不同的蛋白质连接技术结合到了蛋白质载体上制备成具有免疫原性的完全抗原。本试验采用 EDC 法进行偶联, 该法反应条件温和, 即使在较低的温度下 (0℃) 也能在中性 pH 值中进行, 但由于该法反应没有选择性, 易形成蛋白质间的聚合物, 而不是均一产物。所以本实验采用两步法进行偶联, 先将含羧基的氧氟沙星分子与 EDC 反应, 活化羧基后, 再加入蛋白反应物, 这样可以减少蛋白质间的交联。并通过紫外扫描和分析反应前后载体蛋白氨基酸组成变化来对人工抗原进行鉴定, 结果表明, 氧氟沙星主要结合在赖氨酸的氨基酸上。一般认为药物与蛋白质的结合比应在 1:10~1:25 之间为宜。本研究人工抗原结合比为 1:2, 虽然远远低于该范围, 但免疫效果也很理想。这可能和 OFLX 的药物结构有关。因此, 完全抗原偶联时半抗原和蛋白的结合比的免疫原性应视不同药物而定。用 OFLX-BSA 免疫 BALB/c 小鼠产生的抗体较复杂, 不只是产生抗 OFLX 一种抗体, 而且还有抗 BSA 的抗体。在此问题上, 本实验在建立间接 ELISA 方法检测抗体时, 采用卵清蛋白 (OVA) 制备包被抗原 OFLX-OVA 包被 ELISA 板, 这样就能够很好的排除抗 BSA 抗体的干扰。

在单克隆抗体的制备中, 阳性率与克隆次数有关, 一般经过连续三次克隆后阳性率应该达到 100%。有人报道, 在克隆时每孔中加入较多数量的细胞可以提高阳性率, 我们也尝试了这种方法, 发现这样会造成单细胞克隆孔数减少, 增加了克隆的次数, 增加工作量。因此, 我们觉得严格按每孔一个细胞或 0.5 个细胞的数量进行稀释, 效果比较好。

目前, 单克隆抗体的大量制备主要有体外培养法和腹水法两种。我们实验采用腹水法大量制备单克隆抗体。单克隆抗体虽然是均一的抗体分子, 但小鼠腹水中含有大量的内含物, 为消除实验中的一些其他物质的干扰, 常需对腹水进行纯化。腹水的纯化应根据单抗的种属、免疫球蛋白的类型、抗体纯度等选择最佳的纯化方法, 同时还要考虑在纯化的过程中保持抗体的活性、纯度和得率等。我们选用辛酸-硫酸铵法对所得的腹水进行纯化, 这种方法比较适用于 IgG₁ 的纯化^[8]。此方法主要运用盐析原理, 方法简单, 纯化率高, 并且能保证抗体的活性。纯化后, 我们用 ELISA 方法对纯

表1 纯化抗体效价检测
Table 1 Detection of the valence of purified antibody

组别	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	1:128000
未纯化抗体	2.032	2.022	1.915	1.728	1.446	1.097	0.688	0.045
纯化抗体	2.115	2.076	1.930	1.600	1.217	0.909	0.566	0.043

化所得的抗体进行了检测,实验结果表明,辛酸-硫酸铵法是比较理想的抗体纯化方法。

总的来说,本试验无论在抗原合成,合成抗原的鉴定还是单克隆抗体的制备方面都取得了较理想的结果。纯化后的抗体具有很高的特异性和灵敏度,为以后研制氧氟沙星免疫学检测试剂盒和继续深入研究氧氟沙星的免疫学检测技术奠定了基础。

参考文献:

- [1] 葛建, 操继跃, 彭玉芬. 氧氟沙星药物动力学研究进展[J]. 中国动物保健, 2004, (5): 41-43.
- [2] Jihuan Duan, Zonghui Yuan. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues[J]. J Agric Food Chem, 2001, (49): 1087-1089.
- [3] Hol tzapple C K, Buckley S A, Stanker L H. Development of antibodies against the fluorquinolone sarafloxacin and molecular modeling studies of cross-reactive compounds[J]. Food and Agricultural Immunology, 1997, (9): 13-26.
- [4] 杨利国, 胡少旭, 魏平华, 等. 酶免疫检测技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998. 242-476.
- [5] C Kamps Hol tzapple, R J Carl in, C Sheffiel d, et al. Analysis of hapten-carrier protein conjugates by nondenaturing gel electrophoresis[J]. Journal of Immunological Methods, 1993, 164: 245-253.
- [6] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001. 155-157.
- [7] 曹军平, 闫桂玲, 刘秀梵, 等. 两种简易高效的单克隆抗体提纯方法[J]. 单克隆抗体通讯, 1995, 11(2): 52-54.
- [8] 刘晓波, 蔡美英, 王霞, 等. 一种简单实用纯化腹水McAb方法——辛酸/硫酸铵法[J]. 华西医科大学报, 1999, 30(4): 455-456.

欢迎订阅 2007 年

《宁夏大学学报(自然科学版)》

《中文核心期刊要目总览》(第4版)、《全国报刊索引》(科技版)确定的综合性科学技术类核心期刊
中国科学技术信息研究所选定的中国科技核心期刊和“中国科技论文统计源期刊”

国家“九五”科技攻关项目——ChinaInfo 集纳科技期刊群学术核心期刊

中国期刊方阵“双效期刊”

俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、《中国学术期刊文摘》固定引用期刊

美国《数学评论》(MR)、《现在数学出版物》固定引用期刊

德国《数学评论》(Zbl Math)、《中国数学文摘》固定引用期刊

《中国物理文摘》、《中国力学文摘》固定引用期刊

美国《化学文摘》(CA)、《中国化学化工文摘》、《中国无机分析化学文摘》固定引用期刊

《中国地理科学文摘》、《中国国土资源文摘》固定引用期刊

《中国地理》(中国人民大学复印报刊资料)、《中国地质文摘》固定引用期刊

英国《动物学记录》(ZR)、《中国生物学文摘》、《中国药学文摘》固定引用期刊

“美国柯尔比科学文化信息中心全球信息网络(WWW)数据库”选用期刊

火炬计划项目“中国学术期刊综合评价数据库”、“中国科学引文数据库”首批刊源

中国科学院“中国科学文献数据库”、“中文科技期刊数据库”固定引用期刊

“中国科技期刊精品数据库”“中国科学技术期刊文摘(CSTA)数据库”首批刊源

主要刊登工业技术、数学、特理学、化学、地理学等学科的论研究和应用研究方面的研究报告、简报、快报等学术论文。

重点专栏: 函数论研究、可持续发展研究、应用化学研究。

季刊 每季末月下旬出版 大16开 96页 定价8.80元/册 全年订价35.20元。

全国各地邮局(所)均可订阅。发行部常年办理邮购。

邮发代号: 74-7 国内刊号: CN 64-1006/S 国际刊号: ISSN 0253-2328

通讯地址: 宁夏银川西夏区文萃北街 217 号 宁夏大学学报学术中心 自然科学版编辑室

邮政编码: 750021 网址: <http://ajc.nxu.edu.cn> E-mail: xuebao@nxu.edu.cn

联系电话: 0951-2061928, 2061948 传真: 0951-2061793 联系人: 周淑霞