

三聚氰胺偶联抗原制备 及其免疫原性分析

赵彭花¹, 张海祥^{1,*}, 李涛², 王鑫¹, 宋卫³, 刘海静², 谢毅¹,

霍雪萍¹, 赵向绒¹, 梁导艳¹, 李元^{1,*}, 胡军^{1,*}

(1. 陕西省人民医院中心实验室, 陕西西安 710068;

2. 陕西省食品药品检验所, 陕西西安 710065;

3. 西安华澳丽康生物工程有限公司, 陕西西安 710061)

摘要: 探讨以 2-氯-4,6-二胺-1,3,5-三嗪(CAAT)作为起始物,与 6-氨基己酸(ACS)连接转化得到半抗原 Mel-ACS,再将其与牛血清白蛋白(BSA)偶联形成具有连接手臂的抗原 BSA-ACS-Mel,用于单克隆抗体(mAb)制备。经过液相色谱、Western blot 及 ELISA 等抗原特性分析,证明半抗原 Mel-ACS 的转化效率达到了 85.9%,且针对 Mel 特异性单抗获得率达到了 42.9%,抗原 BSA-ACS-Mel 免疫原性较好,完全可以适用于三聚氰胺分子的特异性检测需要。这对其余小分子抗原的合成也起到一定的指导作用。

关键词: 三聚氰胺, 抗原, 单克隆抗体, 免疫原性

Preparation and immunogenicity analysis of melamine conjugate antigen

ZHAO Peng-hua¹, ZHANG Hai-xiang^{1,*}, LI Tao², WANG Xin¹, SONG Wei³, LIU Hai-jing²,

XIE Yi¹, HUO Xue-ping¹, ZHAO Xiang-rong¹, LIANG Dao-yan¹, LI Yuan^{1,*}, HU Jun^{1,*}

(1. Center Laboratory, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China;

2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710065, China;

3. Xi'an Huaaolikang Biology Engineer Co., Ltd., Xi'an 710061, China)

Abstract: The starting material 2-chloro-4,6-diamine-1,3,5-triazine (CAAT) reacted with 6-aminocaproic acid (ACS) to create a hapten Mel-ACS, then this hapten was conjugated with bovine serum albumin (BSA) to form BSA-ACS-Mel, which was supposed to have a connection arm and would be used as an antigen for the preparation of monoclonal antibody (mAb). Antigenic characteristics analysis by HPLC, Western blot and ELISA proved that the yield of hapten Mel-ACS reached 85.9% and specific monoclonal antibodies against Mel reached 42.9%. The antigen BSA-ACS-Mel had good immunogenicity and can be applied to detect melamine molecule specifically. This method played a guiding role in the synthesis of other small molecule antigens.

Key words: melamine; antigen; monoclonal antibody; immunogenicity

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)13-0329-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.060

三聚氰胺(Melamine, Mel), 俗称密胺、蛋白精, IUPAC 命名为“1,3,5-三嗪-2,4,6-三胺”, 分子式 $C_3N_6H_6$, 是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 它是一种用途广泛的基本有机化工中间产品^[1]。由于三聚氰胺分子中含有大量氮元素, 而常规的“凯氏定氮法”检测食品或饲料中蛋白质含量时都是通过检测蛋白里面的氮来推算蛋白质含量, 不能排除这类“伪

蛋白氮”的干扰, 因而被一些不法分子利用, 以提高其产品中的蛋白质含量。2008 年 10 月, 我国制定了乳品中三聚氰胺管理限量值, 婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 1mg/kg; 含乳 15% 以上的其它食品中三聚氰胺的限量值为 2.5mg/kg^[2]。

目前三聚氰胺检测主要是以气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法为

收稿日期: 2014-09-04 + 并列第一作者。

作者简介: 赵彭花(1984-), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 生物化学合成及应用。

张海祥(1975-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 生物技术。

* 通讯作者: 李元(1960-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物学。

胡军(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 免疫学。

基金项目: 陕西省食品药品快速检测公共服务平台建设项目(2014FWPT-01); 陕西省科学技术研究发展计划项目(2014K12-05)。

主^[3-5],这些检测方法所需设备价格昂贵,仪器操作复杂,检测人员需受过专业训练,而且存在适用范围和使用成本等限制,所以研制特异性强、灵敏度高、操作简便的三聚氰胺检测方法是十分必要的。以单克隆抗体为基础的快速免疫检测技术具有快速便捷、特异性强、敏感性高等显著优点^[6-7],能够较好的满足对三聚氰胺的快速检测需要,是目前三聚氰胺检测技术研究的热点。但是由于三聚氰胺本身分子量较小(MW:126.12),不具免疫原性,无法制备单克隆抗体^[8],限制了快速免疫检测技术的应用。有文献^[9]报道,载体蛋白偶联带有6个碳连接手臂的三聚氰胺抗原有利于减少抗原抗体识别时空间位阻作用,更适合做免疫原,但其免疫原性如何,是否可以刺激机体产生特异性抗体?尚未见报道。

因此,在前期相关研究基础上,本文对三聚氰胺抗原的制备方法进行优化,在偶联载体与三聚氰胺分子之间加入连接手臂,分析其免疫原性。这不仅对获得特异的三聚氰胺单抗有重要意义,而且对其它的小分子抗原的制备提供参考思路,具有较高的实用价值。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三聚氰胺标准品 日本和光纯药业株式会社;2-氯-4,6-二胺-1,3,5-三嗪(CAAT)、2-羧酸-4,6-二胺-1,3,5-三嗪、6-氨基己酸(ACS)、氯金酸、柠檬酸钠、三聚氰胺单抗、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠多抗、牛血清白蛋白(BSA)单抗 Sigma公司;BSA Roche公司;鼠源单克隆抗体亚型检测试剂盒,Imject Immunogen EDC Kit with mcKLH and BSA试剂盒 美国Pierce;其余化学试剂 国药集团,分析纯。

Epoch 酶标仪 美国BioTek公司;NanoDrop 2000c 蛋白浓度测定仪 美国Thermo公司;HP1200 高效液相仪 美国Aglient公司;Quattro Premier 质谱 日本Waters公司;DF-1 集热式磁力搅拌器 常州国华电器有限公司;RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;电泳仪 北京市六一仪器厂;752N 紫外可见分光光度计 上海精科仪器有限公司;WRS-5A 熔点仪 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 三聚氰胺偶联抗原的制备

1.2.1.1 制备无连接手臂的三聚氰胺偶联抗原(BSA-Mel) 使用Imject Immunogen EDC Kit with mcKLH and BSA试剂盒,连接方法详见说明书。将2mg的BSA加入200 μ L的试剂盒连接缓冲液,将1mg EDC溶于超纯水100 μ L中,混匀,室温反应1h,加0.35mg的三聚氰胺,4 $^{\circ}$ C搅拌,过夜。然后用10mmol/L, pH7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)透析除去未反应游离小分子。具体连接过程如图1所示。

三聚氰胺等小分子化学物质,一般只有反应原性,没有免疫原性,无法作为抗原直接免疫动物制备单抗。所以,必须将其连接到一些大分子载体蛋白上,形成偶联物-半抗原,借助大分子T细胞表位间

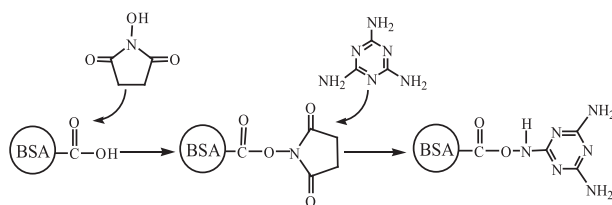


图1 无连接手臂三聚氰胺偶联抗原(BSA-Mel)合成示意图

Fig.1 Synthesis route of melamine conjugate antigen(BSA-Mel)

接诱导B细胞激活、分化增殖,产生针对半抗原的特异性抗体^[10-11]。而载体蛋白除应具有较好的免疫原性外,还应具有足够的能反应的侧链活性基团,以便与抗原连接。相比于卵清蛋白(OVA)每个分子上平均含有20个氨基基团,钥孔血蓝蛋白(KLH)每个分子上平均含有6.9个氨基基团,一个BSA分子上平均含有多达59个氨基基团^[12],因此实验中选择BSA为抗原的载体蛋白。

为了比较不同的偶联方式转化形成抗原的免疫原性,以常见的三聚氰胺直接与BSA偶联的方式合成抗原。由于Mel与BSA在碱性有机溶剂中反应时会导致BSA变性,因此选用较温和的半抗原连接试剂盒,直接将Mel与BSA转化连接得到BSA-Mel。

1.2.1.2 制备带连接手臂的三聚氰胺抗原(BSA-ACS-Mel) 参考文献^[6]合成三聚氰胺与BSA之间带有6个碳连接手臂的目标抗原,具体的合成路线如图2所示。

连接转化三聚氰胺半抗原(Mel-ACS):分别称取CAAT 0.5g(3.4mmol)和ACS 0.5g(3.8mmol),溶于体积浓度为75%的乙醇溶液,加入缚酸剂,80 $^{\circ}$ C回流滴加24h。用薄层层析法检测反应进度,展开液组成及体积比例(乙酸乙酯:甲醇:甲酸=8:2:1),紫外灯显色检测,半抗原及前体的最大紫外吸收波长为241nm。将反应产物放入旋转蒸发器中蒸干,滴加质量浓度为10%的柠檬酸水溶液,调节酸碱度至pH2~3。过滤后,滤液减压浓缩蒸干,即为目标产物(Mel-ACS)。为比较不同缚酸剂的作用效果,反应过程中分别等摩尔(即均以金属阳离子四倍于ACS的量)加入NaOH 0.61g(15.2mmol)、KOH 0.85g(15.2mmol)、Na₂CO₃ 0.81g(7.6mmol)、NaHCO₃ 1.29g(15.2mmol)和K₂CO₃ 1.05g(7.6mmol)进行比较。

活化三聚氰胺半抗原:称取Mel-ACS 20mg置于反应瓶中,依次加入N-羟基丁二酰亚胺(NHS)17mg(0.148mmol)和1mL二甲基甲酰胺(DMF),搅拌溶解,然后加入N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)31mg(0.15mmol),于4 $^{\circ}$ C搅拌过夜,离心除去白色沉淀,得到上清液。

合成三聚氰胺偶联抗原(BSA-ACS-Mel):在上清溶液中滴加溶有113mg BSA的PBS缓冲液(10mmol/L, pH7.4)8mL。混合物4 $^{\circ}$ C搅拌过夜,最后用PBS透析,除去小分子杂质。

由于三聚氰胺的分子结构高度对称,三个氨基之间活性相同,反应活化过程难以控制,因此,选用结构与之接近但化学性质较活泼的氯代物CAAT作

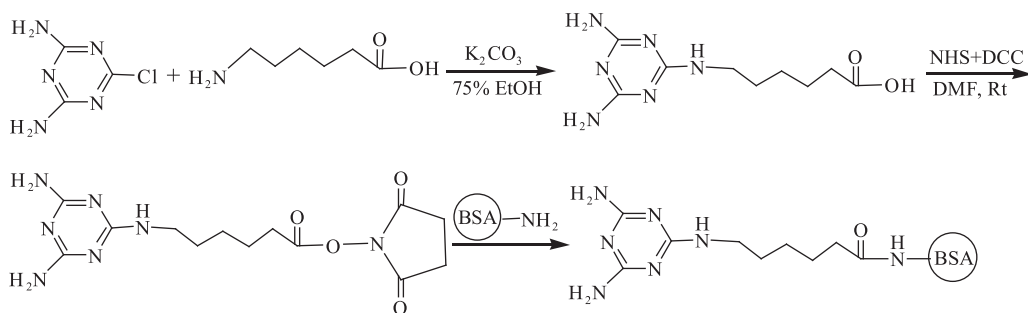


图2 带手臂三聚氰胺偶联抗原(BSA-ACS-Mel)合成示意图

Fig.2 Synthesis route of melamine conjugate antigen(BSA-ACS-Mel)

为反应起始物。通过 CAAT 活泼的氯与 6 个碳连接手臂 ACS 的氨基反应,连接形成 Mel-ACS,然后活化 ACS 端的羧基端,在比较温和的条件下将 Mel-ACS 与 BSA 连接。

1.2.2 三聚氰胺偶联抗原的性质鉴定

1.2.2.1 三聚氰胺半抗原(Mel-ACS)的质谱表征

按 1.2.1.2 的方法,将所得纯化目标物进行质谱表征,质谱仪的工作条件为: N_2 激光 337nm,4 次/秒脉冲,加速电压 20kV,真空度 5×10^{-8} mbar,真空管长度为 1.5m,线性模式下操作,所得数据用 Bruket XMASS 软件分析。

1.2.2.2 三聚氰胺半抗原的色谱测定 按 1.2.1.2 的方法,将所得的目标产物及反应前加入的 CAAT、ACS 进行色谱分析,二极管阵列检测器波长 215nm 条件下 HP1200 高效液相色谱仪检测。

1.2.2.3 CAAT 转化半抗原效率测定 将 1.2.1.2 合成三聚氰胺半抗原(Mel-ACS)中所得的白色固体称重,熔点仪测熔点,并计算半抗原 Mel-ACS 的转化效率。

Mel-ACS 的转化率(%)

$$= \frac{\frac{\text{纯化的合成产物质量}}{\text{色谱纯度百分率} \times 240}}{\text{反应初始投入 CAAT 质量}} \times 100$$

1.2.2.4 三聚氰胺偶联抗原反应原性鉴定 ELISA 法鉴定三聚氰胺偶联抗原:包被 BSA-Mel、BSA-ACS-Mel 及 BSA,用最佳稀释浓度的特异三聚氰胺单抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠多抗为二抗,四甲基联苯胺(TMB)显色。

Western blot 鉴定三聚氰胺偶联抗原:BSA-Mel、BSA-ACS-Mel 及 BSA 进行电泳,特异三聚氰胺单抗作一抗,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠多抗作二抗,二氨基联苯胺(DAB)显色。

1.2.3 三聚氰胺偶联抗原的免疫原性分析

1.2.3.1 三聚氰胺单克隆抗体的制备 用合成的三聚氰胺抗原分别免疫 Balb/C 小鼠,3 次免疫后,取其脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞融合,用 ELISA 法筛选分泌抗体的阳性细胞,用有限稀释法进行亚克隆,经过 3 次克隆后,建立稳定的杂交瘤细胞系,冻存。复苏细胞,扩大培养,收集细胞培养上清^[13]。

1.2.3.2 三聚氰胺单克隆抗体生物学特性鉴定 抗体类别鉴定:采用 SBA Clonotyping™ System/HRP 抗体类型和亚类鉴定试剂盒,利用 ELISA 双抗夹心法

鉴定小鼠 B 淋巴细胞杂交瘤培养上清中单克隆抗体的类别。采用羊抗鼠抗体包被微孔板,与加入的培养上清中的小鼠抗体结合,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗小鼠抗体分别反应,最后用 TMB 底物系统显色并用稀硫酸终止,通过酶标仪检测吸光度判断被测单克隆抗体的类别。

1.2.3.3 单克隆抗体反应性鉴定 包被 BSA-Mel 及 BSA-ACS-Mel 抗原于聚苯乙烯酶标板,分别加入免疫制得的细胞培养上清孵育;以辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠多克隆抗体为二抗,TMB 底物显色;2M 的硫酸水溶液终止,酶标仪 A_{450nm} 检测。

1.2.3.4 单克隆抗体的特异性鉴定 采用竞争 ELISA 法,选取反应性强的单克隆抗体,以间接 ELISA 测得 A_{450nm} 在 1.0 左右的稀释度作为工作浓度。将三聚氰胺标准品梯度稀释,酶标板用 $4\mu\text{g/mL}$ 的 Mel-ACS-BSA 包被,质量浓度为 2% 的 PBS 溶液封闭后,加入不同浓度的竞争三聚氰胺溶液 $50\mu\text{L}$ 和稀释为工作浓度的三聚氰胺单抗 $50\mu\text{L}$,混匀后, 37°C 孵育 1h。同时设空白对照,依据 A_{450nm} 的变化判断是否发生竞争反应。

2 结果与分析

2.1 合成三聚氰胺半抗原(Mel-ACS)的条件优化

在合成半抗原(Mel-ACS)的过程中,参考文献^[9],通过加入不同的缚酸剂 NaOH、KOH、 Na_2CO_3 、 NaHCO_3 和 K_2CO_3 进行比较,结果只有 K_2CO_3 的催化效果最佳,转化率达 85.9% (见表 1)。

在转化连接带手臂的半抗原时,对 Mel 与 ACS 的反应过程中加入等摩尔的缚酸剂,能吸收反应中产生的酸,避免影响反应或反应平衡。各组分经过熔点定性、色谱纯度等分析比较,使用 K_2CO_3 的催化性能明显好于 NaOH、KOH、 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 ,生成产物 Mel-ACS 的转化连接效率高于其他缚酸剂的效率,达到了 85.9%,为文献^[9]报导 6.6% 的十几倍。可能是由于 K_2CO_3 碱性相对较弱,在反应体系中向副产物提供未共用电子对的能力也较弱,反应的副产物少,CAAT 转化成 Mel-ACS 的反应效率较高。

2.2 三聚氰胺半抗原的鉴定

2.2.1 Mel-ACS 高效液相色谱图 对于转化 Mel-ACS 前所用的原料 CAAT(溶于 DMF)、ACS(溶于水)以及转化后的 Mel-ACS(溶于水)在二极管阵列检测器波长 215nm 条件下用 HP1200 高效液相色谱

表1 不同缚酸剂对三聚氰胺半抗原合成的影响

Table 1 Effect of different acid binding agents for the synthesis of melamine haptens

项目	NaOH	KOH	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	K ₂ CO ₃
熔点(℃)	185.1	185.4	185.2	185.1	185.5
色谱纯度(%)	96	96	96	95	95
物质的量(mmol)	0.18	0.21	1.46	2.48	2.92
Mel-ACS 转化率(%)	5.3	6.2	42.9	72.9	85.9

仪进行检测,其色谱如图3所示。

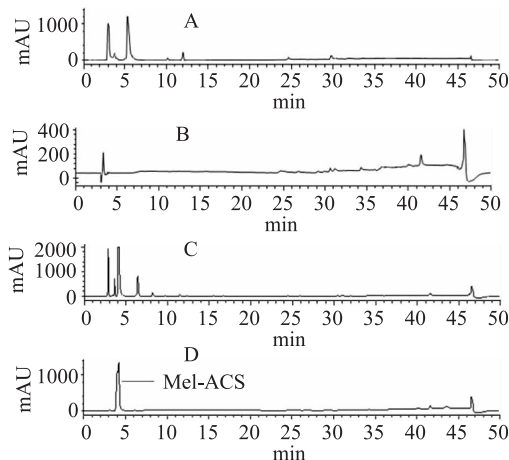


图3 三聚氰胺半抗原色谱图

Fig.3 Chromatogram of melamine haptens

注:A:CAAT;B:ACS;C:Mel-ACS 纯化前;D:Mel-ACS 纯化后。

由 CAAT、ACS 及纯化前的 Mel-ACS 色谱图对比,可以看出纯化前的 Mel-ACS 有别于 CAAT (3.15min) 和 ACS,有新峰(4.28min)生成,对该峰进行纯化得到纯化后的 Mel-ACS,见图 3D,产物进一步做质谱分析。

2.2.2 Mel-ACS 质谱图 对纯化后的 Mel-ACS 的主峰进行质谱检测分析,其结果如图 4 所示。

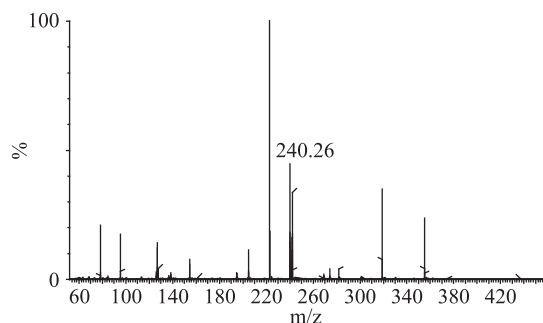


图4 三聚氰胺半抗原质谱图

Fig.4 Mass spectrometry of melamine haptens

半抗原 Mel-ACS 的分子式为 C₉H₁₆N₂O₂,分子量为 240.26,转化产物 Mel-ACS 经质谱鉴定,质谱图有一峰值 240.26,说明连接转化是成功的。

2.3 三聚氰胺抗原反应原性的鉴定

使用三聚氰胺特异性单抗、BSA 单抗及作为对照的 PBS 分别与包被的 BSA-ACS-Mel、Mel-BSA 及 BSA 进行 ELISA 实验,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠作为二抗反应,TMB 显色;结果只有 BSA-ACS-Mel 抗原与三聚氰胺特异性结合,如表 2 所示。

表2 三聚氰胺偶联抗原反应性比较

Table 2 Comparison of melamine conjugate antigens reactivity

包被抗原	阴性对照 (PBS)	Mel 单抗	阳性对照 (BSA 单抗)
BSA-ACS-Mel	-	+	+
BSA-Mel	-	-	+
BSA	-	-	+

注:“-”阴性;“+”阳性。

同时,对 BSA-ACS-Mel、BSA-Mel、BSA 进行电泳,特异性三聚氰胺单抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠多抗为二抗,DAB 显色,做 Western blot,结果如图 5 所示。

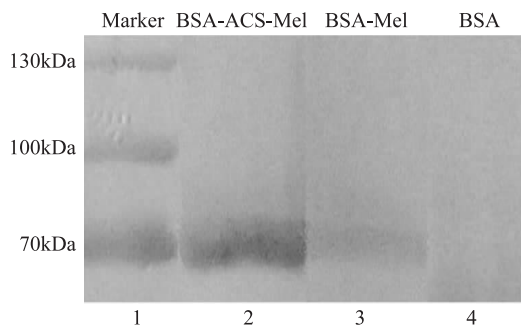


图5 三聚氰胺偶联抗原 Western blot 鉴定示意图

Fig.5 Identification of melamine conjugate antigen by Western blot

注:Marker 中 70ku 位置条带为 BSA,

在 2,3 泳道相同位置均有显色条带,泳道 4 则无显色。

在偶联 BSA 后,由于抗原分子量太大,质谱、色谱等检测方法已不适用,因此主要采用 ELISA、Western blot 等生物学方法测定。从 Western blot 电泳图可以看出,泳道 2 和 3 特异的三聚氰胺抗体对两种三聚氰胺偶联抗原均有显色,而与泳道 4 的 BSA 不反应,说明特异的三聚氰胺单抗可以识别偶联抗原并与其反应显色,证明三聚氰胺已偶联到 BSA 上;泳道 2 反应明显强于泳道 3,表明带手臂的偶联抗原反应原性更强。而将两种抗原均包被 ELISA 板,用特异三聚氰胺单抗做一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠多克隆抗体为二抗,TMB 染色,结果只有带连接手臂的偶联抗原与特异三聚氰胺单抗结合显色,无连接手臂的偶联抗原不与特异三聚氰胺单抗结合显色。进一步表明带连接手臂的三聚氰胺偶联抗原可能由于手臂的托举提呈作用,Mel 分子显现出来,因此具有更好的反应原性。

2.4 三聚氰胺免疫原性的鉴定

使用两种三聚氰胺偶联抗原免疫小鼠,用各自的

免疫抗原筛选,分别制备得到 14 株和 34 株单抗,经三聚氰胺阻断鉴定,BSA-ACS-Mel 抗原免疫所获得的单克隆抗体中有 6 株具有较好的反应特异性,占总数的 42.9%,免疫原性较强。而 BSA-Mel 抗原免疫所获得的单克隆抗体则未能筛选出特异性的三聚氰胺单抗。以两种不同抗原免疫得到的单克隆抗体亚类数量及其用三聚氰胺阻断实验的测定结果如表 3 所示:

表 3 三聚氰胺偶联抗原免疫原性对比

Table 3 Comparison on immunity of melamine conjugates antigens

单抗亚类	特异性单抗/单抗		特异性单抗获得率(%)	
	BSA-ACS-Mel	BSA-Mel	BSA-ACS-Mel	BSA-Mel
IgM	0/4	0/6	0	0
IgG	6/10	0/28	60	0
合计	6/14	0/34	42.9	0

经过动物体内免疫,带连接手臂的抗原得到了 14 株单抗,其中 6 株三聚氰胺单抗具有特异性,而无连接手臂的抗原得到 34 株单抗,但经阻断实验证明均不具有特异性。说明无连接手臂的偶联抗原免疫原性弱,很难获得针对三聚氰胺的特异性单抗。而带连接手臂的三聚氰胺抗原,由于手臂有利于减少抗原抗体识别时的空间位阻作用,能将三聚氰胺分子提呈到整个抗原分子的表面,因而具有较好的免疫原性,更适合做为免疫原。

3 结论

通过改进抗原制备方法得到带手臂的三聚氰胺抗原,免疫动物后获得特异性单克隆抗体,经 ELISA、Western blot 等方法进行免疫原性分析,证明该方法具有转化效率高(转化率 85.9%),偶联抗原的反应原性及免疫原性(特异性单抗获得率 42.9%)均较好等优点,可以用于三聚氰胺的快速免疫检测等方面,并对其它小分子抗原的合成和鉴定提供参考。

(上接第 324 页)

54-65.

[19] Alexander WP, Lauren KW, Rosina MG. Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces [J]. J AM CHEM SOC, 2002, 124: 14601-14607.

[20] Nuzzo R G, Fusco F A, Allara D L. Spontaneously organized molecular assemblies (3): preparation and properties of solution

(上接第 328 页)

结构与功能. 书名原文: Starch in Food: Structure, Function and Applications, edited by ELIASSON AC. 赵凯, 等译, 2009, 中国轻工业出版社, 北京.

[11] 顾正彪. DSC 在淀粉研究中的应用 [J]. 无锡轻工大学学报, 1996, 15(2): 179-182.

[12] (日) 二国二郎. 淀粉科学手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.

[13] 项丽霞, 田翠华, 李洁, 等. 莲藕淀粉糊化温度的测定 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 63-64.

[14] 闵燕萍, 陈宗道, 耕耕, 等. 藕淀粉的加工性能研究 [J]. 农业工程学报, 2007, 27: 259-263.

参考文献

[1] Neerman MF, Chen HT, Parrish AR, et al. Reduction of drug toxicity using dendrimers based on melamine [J]. Mol Pharm, 2004, 1(5): 390-393.

[2] 冯楠, 路勇, 吴颖, 等. 超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定多种食品中三聚氰胺的残留量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(2): 248-250.

[3] GC-MS Screen for the presence of melamine and cyanuric acid [S]. FDA-ORA Forensic chemistry center SOP T015.

[4] Updated FCC developmental melamine quantitation (HPLC-V) [S]. FDA-ORA Forensic chemistry center SOP T015.

[5] 沈昊宇, 赵永纲, 王乐屏, 等. 三聚氰胺及其相关物质的性质、危害与检测技术 [J]. 化学通报, 2009(4): 341-349.

[6] 孔君, 刘菁, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 170-173.

[7] 夏骏, 赖卫华, 涂继平, 等. 三聚氰胺胶体金免疫层析方法的建立 [J]. 食品科学, 2013, 34(20): 139-143.

[8] 饶钦雄, 童敬, 王金芳, 等. 饲料和食品中三聚氰胺的毒性及残留检测方法的研究进展 [J]. 饲料工业, 2009, 30(11): 34-36.

[9] Lei HT, Shen YD, Song LJ, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 665: 84-90.

[10] 宋建武, 晁志, 董为人. 石杉碱甲人工抗原的合成、鉴定及免疫原性分析 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2128-2130.

[11] 陈继明, 龚晓明, 陆承平. T 细胞表位研究进展 [J]. 中华微生物学与免疫学杂志, 1998, 18(1): 78-82.

[12] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 7-8.

[13] 任立松, 王颖, 党荣理, 等. 苏丹红单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(2): 201-203.

adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces [J]. J Am Chem Soc, 1987, 109(8): 2358-2361.

[21] Peng Zuo, XiuJun Li, Delfina C, et al. A PDMS/paper/glass hybrid microfluidic biochip integrated with aptamer-functionalized graphene oxide nano-biosensors for one-step multiplexed pathogen detection [J]. Lab Chip, 2013, 13: 3921-3928.

[15] 秦志荣, 许荣年, 汪庆旗, 等. 藕淀粉颗粒性质的研究及藕粉产品的鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 136-138.

[16] 高群玉, 吴磊, 刘 kun. 甘薯淀粉糊性质的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 153-155.

[17] 谭洪卓, 谭斌, 刘明, 等. 甘薯淀粉性质与其粉丝品质的关系 [J]. 农业工程学报, 2009, 25(4): 286-292.

[18] COLLADO LS, MABESA RG, CORKE H. Genetic variation in the physical properties of sweet potato starch [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 4195-4201.

[19] DEFLOOR I, DEHING I, DELCOUR JA. Physicochemical properties of cassava starch [J]. Starch/Stärke, 1999, 50: 58-64.