

重金属铜的单抗的制备 及免疫学检测方法的建立

郝代玲, 黄建芳, 杨浩, 冯沛然, 张宇, 王宏, 向军俭*

(暨南大学抗体工程研究中心, 广东省分子免疫与抗体工程重点实验室, 广东广州 510632)

摘要:目的:制备针对重金属铜离子的单克隆抗体,建立 Cu^{2+} 的间接和直接竞争ELISA检测法,实现对 Cu^{2+} 的快速定量测定。方法:利用双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA将 Cu^{2+} 分别与载体蛋白BSA和OVA偶联,制备免疫原和检测原;用免疫原免疫Balb/c小鼠;细胞融合后,通过间接及间接竞争ELISA筛选稳定分泌抗重金属铜的单克隆抗体的杂交瘤细胞株;制备腹水型单抗并进行鉴定;建立间接竞争ELISA和直接竞争ELISA。结果:成功筛选出4株稳定分泌抗重金属铜的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其中G8制备出腹水型单抗效价为 5×10^5 倍,抗体亚型为 IgG_1 型,轻链类型为 κ 型,特异性检测结果表明该单抗对NOTA及 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 等其金属离子交叉反应率远低于2%,与 Mg^{2+} 交叉反应率小于8%,表明单克隆抗体G8对重金属 Cu^{2+} 具有很强的特异性,不会干扰结果的准确性;建立间接竞争ELISA的检测灵敏度为29.8 ng/mL,检测限为2.4 ng/mL,线性范围为4.5~196.7 ng/mL;直接竞争ELISA检测法的检测灵敏度为12.89 ng/mL,检测限为0.88 ng/mL,检测范围为1.72~96.58 ng/mL。结论:成功制备出抗重金属铜离子的单克隆抗体,并建立了间接竞争ELISA和直接竞争ELISA。

关键词:铜离子,单克隆抗体,间接竞争ELISA,直接竞争ELISA

Preparation of monoclonal antibody against copper and establishment of immunological detection methods

HAO Dai-ling, HUANG Jian-fang, YANG Hao, FENG Pei-ran, ZHANG Yu, WANG Hong, XIANG Jun-jian*

(Antibody Engineering Research Center, Jinan University, Guangdong Province Key Laboratory of
Molecular Immunology and Antibody Engineering, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Objective: Prepare monoclonal antibodies (McAbs) against copper, and establish indirect and direct competitive enzyme-linked immunoassay for detection of copper. Finally rapid quantitative determination of Cu^{2+} was achieved. Methods: Using double functional chelating agent p-SCN-Bn-NOTA to connect Cu^{2+} with carrier protein BSA and OVA, Immune Balb/c mice. After cell fusion, positive cells that stability secrete McAbs against Cu^{2+} were selected through indirect and indirect competitive ELISA. Preparation and identification of McAbs. Established indirect and direct competitive ELISA detection method. Results: 4 hybridoma cell lines that stability secreting McAbs against Cu^{2+} were prepared successfully, the titer of G8 was 5×10^5 . The subtype and type of light chain were IgG_1 and κ , specific detection showed that the cross-reactivity of McAb with Mn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and NOTA were less than 2%, except for Mg^{2+} which was less than 8%, this showed high specificity of this antibody. The detection sensitivity of established indirect competitive ELISA was 29.8 ng/mL, Detection of limit was 2.4 ng/mL and the detection rang was from 4.5 to 196.7 ng/mL. The detection sensitivity of established direct competitive ELISA was 12.89 ng/mL, detection of limit was 0.88 ng/mL and the detection rang was from 1.72 to 96.58 ng/mL. Conclusion: Successfully prepared McAbs against Cu^{2+} and established indirect competitive ELISA and direct competitive ELISA.

Key words: ion copper; monoclonal antibody; indirect competitive ELISA; direct competitive ELISA

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)19-0245-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.045

随着工业经济的发展,近年来,我国土壤重金属污染事件频发,不仅对耕地与农产品质量构成严重

威胁,还直接损害了民众身体健康,影响社会稳定^[1],各类水环境中重金属污染日趋加剧亦成为不争的事

收稿日期: 2017-04-11

作者简介: 郝代玲(1990-),女,硕士研究生,研究方向: 抗体制备及应用, E-mail: dailing0918@163.com。

* 通讯作者: 向军俭(1952-),男,博士,教授,研究方向: 抗体制备及应用, E-mail: txjj@jnu.edu.cn。

基金项目: 特异性配体快速筛选技术及农产品、食品入侵毒物快速检测技术的研究(2012A020200003)。

实^[2]。在人类生存生活的环境中,重金属广泛存在于空气、泥土甚至是食品、饮用水中,严重危害人们的生命健康。人体摄入过量铜会引起一系列病变^[3],急性铜中毒可引起胃肠道粘膜刺激症状,如恶心、呕吐、腹泻,甚至溶血性贫血,肾功能衰竭,休克、昏迷或死亡。慢性摄入铜过高,可引起呼吸系统疾病,甚至出现尘肺等^[4]。因此,加强食品和环境中的重金属铜的监测检测具有重要意义。

传统的重金属检测方法多采用物理化学方法,如原子吸收光谱法(AAS)、原子荧光光谱法(AFS)、电感耦合等离子体光谱法(ICP)、高效液相色谱法及生物传感器等^[5],新的食品安全国家标准(GB5009.13-2017)^[6]规定了食品中铜含量测定的石墨炉和火焰原子吸收光谱法、电感耦合等离子体质谱法和电感耦合等离子体发射光谱法。其中这些检测法存在一定的缺点,例如检测费用昂贵,样品前处理繁琐,周期长,需要专业设备及操作人员等,难以适应突发性的环境污染事件或大规模的环境质量检测^[7]。Wiley D E等^[8]最先用谷胱甘肽-Hg复合物免疫小鼠制备了对Hg(II)有特异性的单克隆抗体。Blake D A等^[9]发现金属络合物也可以被用来作免疫动物制备金属的特异性抗体。

本实验室前期已对重金属免疫学快速检测技术^[10]进行深入研究,并制备出针对重金属镉的高特异性抗体,建立了直接竞争ELISA,实现对重金属镉的快速高效准确的实时监测检测^[11]。

本研究成功制备了重金属铜单抗,并建立了检测铜离子的间接竞争ELISA和直接竞争ELISA,为环境和食品中的重金属铜的检测提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

CuSO₄·5H₂O 天津市大茂化学试剂厂;p-SCN-Bn-NOTA(S-2-(4-isothiocyanato-benzyl)-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)双功能螯合剂 西安凯新生物科技有限公司;Sp2/0小鼠骨髓瘤细胞 暨南大学抗体工程中心传代保存;6~8周龄SPF级Balb/c雌性小鼠 南方医科大学动物中心; Freund完全佐剂、Freund不完全佐剂、次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)、次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷(hypoxanthine-thymidine, HT)、聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG) Sigma公司;RPMI1640培养基、胎牛血清 Gibco公司;ProteinG亲和层析柱 GE公司5 mL预装柱;实验用水 milli-Q超纯水。

ELx808™酶标仪 BioTek; 991超低温冰箱 Thermo; ECO超净工作台 Thermo; 311细胞培养箱 Thermo; CKX41倒置显微镜 OLYMPUS; Synergy H1全波长酶标仪 BioTek; 5810R低速离心机 Eppendorf; 5804R超低温离心机 Eppendorf; 5804R超低温离心机 Eppendorf; TS-2脱色摇床 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Delta 320 pH计瑞士 Mettler-Toledo; BSA224S分析天平 德国

Sartorius; HL-2恒流泵 上海泸西机电厂; HD-3000核酸蛋白检测仪 上海嘉鹏科技有限公司; X-Series 2电感耦合等离子体发射光谱质谱仪 美国赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 重金属铜单克隆抗体的制备

1.2.1 阳性细胞株的筛选 通过双功能螯合剂p-SCN-Bn-NOTA将Cu²⁺与载体蛋白BSA和OVA连接起来^[12-13]。取6~8周龄的Balb/c小鼠进行用免疫原进行免疫,每隔两周免疫一次,免疫三次后,小鼠尾静脉取血测定血清效价,选择效价高的小鼠进行加强免疫,3 d后细胞融合,通过间接及间接竞争ELISA筛选出稳定分泌针对重金属铜的抗体的阳性细胞株。

1.2.2 腹水型单抗的制备 选取处于对数生长期的针对重金属铜的阳性细胞株G8,以5×10⁵ cells/只腹腔注射预先用佐剂处理过的Balb/c小鼠,两周后注意观察小鼠腹部膨胀程度,取小鼠腹水,进行离心,经过Protein-G亲和层析纯化单抗后备用。

1.3 间接ELISA鉴定单抗效价

将检测原以合适浓度包被于酶标板中,2倍梯度倍比稀释G8腹水单抗加入酶标板中,37℃孵育1h; PBS-T洗涤3次(3 min/次),再加入1:8000稀释的HRP标记羊抗小鼠IgG,每孔100 μL,37℃孵育40 min;同前洗涤5次,再分别加入100 μL TMB底物显色液,反应10 min后用50 μL H₂SO₄(2 M)终止显色反应;检测OD_{450 nm}。

1.4 腹水单抗特异性鉴定

采用间接竞争ELISA测定重金属单抗与Mn²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺等金属离子和螯合剂NOTA的交叉反应:分别制备各金属离子与单功能螯合剂NOTA的螯合物;将制备的检测原包被于板底,5%脱脂奶粉封闭;间接竞争ELISA操作后,测定OD_{450 nm}。

1.5 Cu²⁺间接竞争ELISA的初步建立

将制备的检测原Cu²⁺-p-SCN-Bn-NOTA-OVA稀释至工作浓度,每孔100 μL包被于板底,37℃恒温孵育3 h后用PBST缓冲液洗涤3次;用5%的脱脂奶粉为封闭液37℃恒温封闭1 h, PBST缓冲液洗涤3次;分别加入50 μL三蒸水作为对照孔和不同浓度稀释的竞争物标准品:3、12.5、25、50、100和200 ng/mL作为竞争孔,再加入工作浓度稀释的G8单抗50 μL,混匀后,37℃恒温箱反应1 h; PBST洗涤三次后,每孔分别加入100 μL适宜浓度稀释的酶标羊抗鼠二抗,37℃显色反应40 min; PBST缓冲液洗涤5次,每孔分别加入100 μL TMB显色液,避光显色10 min;每孔加入50 μL H₂SO₄(2M)终止反应,测定OD_{450 nm}值,计算抑制率。每次检测均用3个平行组,以各重复样的平均值为检测结果。

1.6 间接竞争ELISA的准确性

在间接竞争ELISA的线性范围内,配制如下4个不同浓度的标准液:5、20、50、100 ng/mL;采用上述间接竞争ELISA测定OD值,每个浓度设置三个复孔,通过标准曲线计算浓度;确定每个标准液检测的精密度和回收率,考察检测方法的准确性。

1.7 Cu²⁺ 直接竞争 ELISA 的初步建立

按照辣根过氧化物酶标记试剂盒对 G8 抗体进行标记,最终得到抗体与 HRP 的螯合物,将适宜浓度 100 ng/mL 的完全抗原 Cu²⁺-p-SCN-Bn-NOTA-OVA 包被于酶标板底,并封闭洗涤;加入 50 μL 酶标抗体和 50 μL 不同浓度稀释的标准竞争物:1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50、100 ng/mL,37 °C 恒温孵育 30 min;PBST 缓冲液洗涤 5 次,每孔分别加入 100 μL TMB 显色液,避光显色 10 min;每孔加入 50 μL H₂SO₄(2M) 终止反应,测定 OD_{450 nm},计算抑制率。

1.8 直接竞争 ELISA 的准确性

方法同 1.6,在直接竞争 ELISA 的线性范围内,配制如下 4 个不同浓度的标准液:5、20、40、80 ng/mL;采用上述 1.7 的直接竞争 ELISA 方法测定 OD 值,通过标准曲线计算标准品浓度;确定每个标准品检测的精密度和回收率,考察检测方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 阳性细胞株的筛选

通过间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 对融合后的细胞进行筛选,最终筛选出 4 株针对重金属铜的单克隆抗体(如图 1),效价分别为 G8:2500, F12:6000, B6:2500, B12:1000。

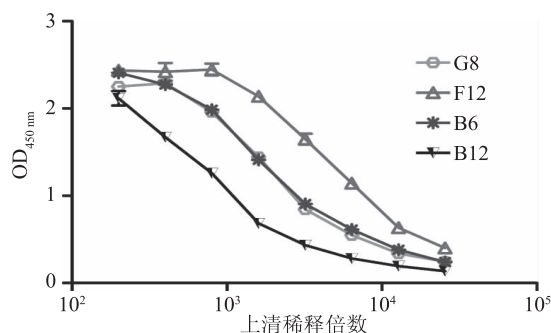


图 1 细胞上清抗体效价

Fig.1 Titer detection of the supernatant antibodies

2.2 腹水型单抗的鉴定

2.2.1 腹水单抗效价的测定 将检测原以适宜浓度进行包被,再加入倍比稀释的 G8 纯化抗体,间接 ELISA 的结果(如图 2)显示 G8 腹水型单抗其效价达 5×10^5 倍。

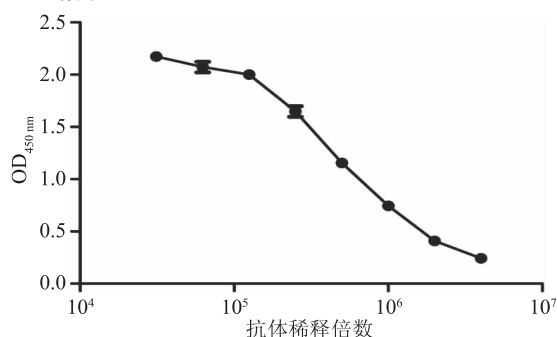


图 2 腹水单抗效价

Fig.2 Titer detection of the ascites

2.2.2 腹水单抗亚型鉴定 采用间接 ELISA,将检测原以适宜浓度进行包被,加入以适宜浓度稀释的小

鼠腹水,再加入稀释 5000 倍的 HRP 标记的羊抗小鼠抗体亚类为二抗,结果如表 1 所示,间接 ELISA 结果显示 4 株抗体亚型均为 IgG1 型,轻链类型为 κ 型。

表 1 抗体亚型鉴定

Table 1 Subtype of the McAb

亚型/轻链类型	B6	B12	G8	F12
IgA	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-
IgG1	+	+	+	+
IgG2a	-	-	-	-
IgG2b	-	-	-	-
IgG3	-	-	-	-
κ	+	+	+	+
λ	-	-	-	-
Ig-HRP	+	+	+	+

2.2.3 腹水单抗特异性鉴定 如表 2 所示,铜单克隆抗体 G8 对 NOTA 及 Mn²⁺、Pb²⁺、Cd²⁺、Zn²⁺ 等金属离子交叉反应小于 2%,与 Mg²⁺ 交叉反应率小于 8%,表明单克隆抗体 G8 对重金属 Cu²⁺ 具有很好的特异性。

表 2 抗体与金属交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity of the antibody with other ion metals

金属离子/NOTA	G8	
	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率(%)
Cu ²⁺	29	100
Mn ²⁺	>5000	<1.00
Pb ²⁺	>100000	<0.05
Mg ²⁺	>400	<8.00
Zn ²⁺	>2000	<1.50
Cd ²⁺	>10000	<0.50
NOTA	>10000	<0.50

2.3 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立与评价

2.3.1 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立 以检测抑制率为纵坐标,以 Cu²⁺ 浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线,检测结果如图 3 所示,间接竞争 ELISA 检测法的标准曲线线性回归方程为 $y = 36.599x - 3.95$, $R^2 = 0.9979$,检测灵敏度(IC₅₀)为 29.8 ng/mL,检测限(LOD, IC₁₀)在 2.4 ng/mL,相对于 ICP 方法检测的 1ppm 检测限有很明显的提高,检测范围(IC₂₀~IC₈₀)

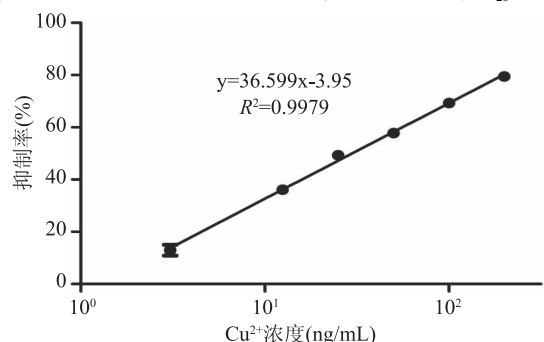


图 3 间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig.3 Standard curve of indirect competitive ELISA

为 4.5~196.7 ng/mL, 可达到《生活饮用水卫生标准》(GB5749-2006) 中对 Cu^{2+} 1ppm 的检测要求^[14]。

2.3.2 间接竞争 ELISA 的准确性评价 在线性范围内配制 4 种不同浓度的标准液, 根据优化条件进行间接竞争 ELISA 检测, 考察方法的准确性, 结果如表 3, 样品添加回收率平均值为 93.7%, 变异系数为 0.49%, 能够满足对重金属残留分析的一般要求。

表 3 间接竞争 ELISA 的准确性实验

Table 3 The accuracies of indirect competitive ELISA

加标浓度 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	标准差 (ng/mL)	变异系数 (%)
5	4.56	91.2	0.07	1.5
20	17.3	86.5	0.05	0.3
50	45.95	91.9	0.06	0.13
100	105.25	105.25	0.03	0.03

2.4 直接竞争 ELISA 标准曲线的建立与评价

2.4.1 直接竞争 ELISA 标准曲线的建立 如图 4 所示, 直接竞争 ELISA 检测法的标准曲线线性回归方程为 $y = 34.302x + 11.915$, $R^2 = 0.9923$, 检测灵敏度 (IC_{50}) 为 12.89 ng/mL, 检测限 (LOD, IC_{10}) 为 0.88 ng/mL, 检测范围 ($\text{IC}_{20} - \text{IC}_{80}$) 为 1.72~96.58 ng/mL, 相对于间接竞争 ELISA, 直接竞争 ELISA 不仅缩短了反应时间, 而且检测灵敏度也提高了一倍, 具有重要应用优势。

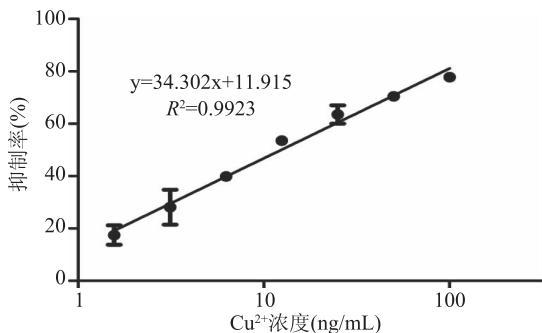


图 4 直接竞争 ELISA 标准曲线

Fig.4 Standard curve of direct competitive ELISA

2.4.2 直接竞争 ELISA 的准确性评价 方法同上, 直接竞争 ELISA 线性范围内配制 4 种不同浓度的标准液, 进行直接竞争 ELISA 检测, 考察此方法的准确性, 结果如表 4, 样品添加回收率平均值为 88.08%, 变异系数平均为 1.71%, 能够满足对重金属残留分析的一般要求。

表 4 直接竞争 ELISA 的准确性实验

Table 4 The accuracies of direct competitive ELISA

加标浓度 (ng/mL)	检测值 (ng/mL)	回收率 (%)	标准差 (ng/mL)	变异系数 (%)
5	3.2	64	0.136	4.25
20	16.83	84.15	0.28	1.71
40	37.16	92.9	0.253	0.68
80	91.4	114.25	0.16	0.18

3 讨论与结论

制备高特异性的抗体首先需要高质量的抗原。

Cu^{2+} 作为小分子抗原, 不足以形成抗原表位来引起机体的免疫反应, 不能引起免疫细胞活化、增殖、分化, 因此无法产生抗体, 我们通过双功能螯合剂将其与载体蛋白连接来形成完全抗原, 目前, 针对 In^{3+} , U^{6+} , Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的此种单克隆抗体已有记录^[15-17]。相对于常用双功能螯合剂: DTPA^[18]、ITCBE^[19]、p-SCN-Bn-DOTA^[20], 本研究所使用的 p-SCN-Bn-NOTA, 尚未在已有的文献中发现应用于重金属完全抗原的制备, 具有创新性。

本研究制备的针对重金属铜的单克隆抗体, 利用双功能螯合剂 p-SCN-Bn-NOTA 将 Cu^{2+} 与载体蛋白 BSA 和 OVA 偶联^[21-22] 制备完全抗原, 通过超滤除去未整合上的金属离子与螯合剂, 然后用制备的抗原免疫小鼠, 得到的单抗具备高效价和高亲和力的特点, 利用该抗体建立的间接竞争 ELISA 和直接竞争 ELISA 灵敏度高、检测范围广, 相对于传统检测方法来说, 检测周期短, 携带方便, 对于环境实时监控检测具有重要意义, 接下来会进一步优化反应条件, 改良检测方法, 为之后的化学发光法的建立优化及实现对于土壤、水源和食品的快速检测提供依据。

参考文献

- [1] 周建军, 周桔, 冯仁国. 我国土壤重金属污染现状及治理战略[J]. 中国科学院院刊, 2014, 29(3): 315-320.
- [2] 王玉杰. 我国水环境重金属污染现状及检测技术研究[J]. 科技视界, 2015(34): 69-70.
- [3] 牛芸民, 杨天林. 若干重要微量元素元素的生物化学功能及其与人体健康的关系[J]. 微量元素与健康研究, 2014, 31(2): 78-80.
- [4] 李青仁, 王月梅. 微量元素铜与人体健康[J]. 微量元素与健康研究, 2007, 24(3): 61-63.
- [5] 赵国欣, 赵明, 李领川. 环境水中重金属离子的现代检测方法研究综述[J]. 中州大学学报, 2016, 33(6): 119-122.
- [6] 2017G B. 食品安全国家标准[S]. 2017.
- [7] 刘箐, 陈国薇, 张超, 等. 生物技术在重金属检测中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(9): 897-901.
- [8] Wylie D E, Lu D, Carlson L D, et al. Monoclonal antibodies specific for mercuric ions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(9): 4104-4108.
- [9] Blake D A, Chakrabarti P, Khosraviani M, et al. Metal binding properties of a monoclonal antibody directed toward metal-chelate complexes [J]. Journal of Biological Chemistry, 1996, 271(44): 27677-27685.
- [10] 刘艳梅, 钟辉, 向军俭. 重金属免疫学快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2014(17): 306-311.
- [11] 刘艳梅, 钟辉, 黄建芳, 等. 直接竞争 ELISA 检测大米样品中的重金属镉[J]. 免疫学杂志, 2015(6): 528-532.
- [12] Cooper M S, Ma M T, Sunassee K, et al. Comparison of 64 Cu-complexing bifunctional chelators for radioimmunoconjugation: labeling efficiency, specific activity, and *in vitro/in vivo* stability [J]. Bioconjugate Chemistry, 2012, 23(5): 1029-1039.
- [13] Kong T, Li X B, Liu G W, et al. Preparation of specific monoclonal antibodies against chelated copper ions [J]. Biological

(下转第 255 页)

检测猪肉中的7种磺胺类药物。

3 结论

本方法制备的亲水性分子印迹聚合物对7种磺胺类兽药具有较高的吸附容量和较好的选择性,在优化的固相萃取条件下,制备的材料对磺胺类兽药的富集倍数大于72,可用于实际样品中磺胺类兽药残留的富集、净化。同时所建立的分子印迹固相萃取-高效液相色谱方法具有方法简单、快速、灵敏度高的特点。

参考文献

- [1]郭怡光,关瑾.分子印迹技术在农药残留检测中的应用[J].辽宁化工,2017,46(2):169-172.
- [2]吕开青,苏荣荣,汤亚如,等.分子印迹在食品药物残留分析中的应用进展[J].广州化工,2017,45(2):18-19.
- [3] Natalia Casado, Damian Perez-Quintanilla, Sonia Morante-Zarcelero, et al. Evaluation of bi-functionalized mesoporous silicas as reversed phase/cation-exchange mixed-mode sorbents for multi-residue solid phase extraction of veterinary drug residues in meat samples[J]. Talanta, 2017, 165: 223-230.
- [4]孙清荣,郭礼强,张金玲,等.HPLC-Q-TOF法筛查鸡肉中48种兽药残留[J].食品研究与开发,2017,38(4):127-132.
- [5]李芳,康怀彬,张瑞华,等.食品中农兽药残留生物传感检测技术的研究进展[J].食品工业科技,2017,38(4):396-400.
- [6]张元,李伟青,周伟娥,等.食品中磺胺类药物前处理及检测方法研究进展[J].食品科学,2015,36(23):340-346.
- [7]田博,金坚,惠人杰,等.兽药残留检测中磺胺嘧啶 ELISA 试剂盒的研制[J].生物加工工程,2017,15(1):69-72.
- [8]许旭,肖远灿,耿丹丹,等.在线柱后衍生-高效液相色谱-荧光检测法同时测定牛肉中16种磺胺类药物残留[J].色谱,2016,34(4):422-428.
- [9]谢瑜杰,呼秀智,孙晓铮,等.胶体金免疫层析技术在水产品磺胺类药物残留检测中的应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(2):375-379.
- [10] Cristina Bach, Virginie Boiteux, Jessica Hemard, et al. Simultaneous determination of perfluoroalkyl iodides, perfluoroalkane sulfonamides, fluorotelomer alcohols, fluorotelomer iodides and fluorotelomer acrylates and methacrylates in water and sediments using solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2016,

1448:98-106.

- [11]张宁.高效液相色谱法测定鸡肉中磺胺类药物研究[J].天津农学院学报,2017,24(1):34-37.
- [12]曹雪琴,陈俊宇,张永权,等.高效液相色谱法测定牛奶中磺胺类药物残留[J].广州化工,2015,43(21):122-124.
- [13] J M Kremarathne, D A Satharasinghe, A R C Gunasena. Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and eggs by high-performance liquid chromatography[J]. Food Control, 2017, 72(8): 276-282.
- [14]严风,李丹妮,吴剑平,等.超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱筛查测定饲料中19种磺胺类药物[J].中国兽药杂志,2016,50(2):29-36.
- [15]李宁,张玉龙,林涛,等.UPLC-MS法同时测定牛奶中磺胺类、喹诺酮类、甾体激素类及四环素类兽药残留[J].分析测试学报,2016,35(6):714-718.
- [16] Qin Yuhong, Freedom Jatamunua, Zhang Jingru, et al. Analysis of sulfonamides, tilmicosin and avermectins residues in typical animal matrices with multi-plug filtration cleanup by liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 1053: 27-33.
- [17] Mala, Zdena, Gebauer, et al. New methodology for capillary electrophoresis with ESI-MS detection: Electrophoretic focusing on inverse electromigration dispersion gradient. High-sensitivity analysis of sulfonamides in waters [J]. Anal Chim Acta, 2016, 935: 249-257.
- [18]张腾,翟俊辉.利用表面等离子共振法检测牛乳中磺胺嘧啶[J].乳业科学与技术,2017,40(1):13-15.
- [19]姜吉刚,王雷,魏光成.微球形磺胺嘧啶分子印迹聚合物合成及识别特性[J].河北师范大学学报(自然科学版),2008,32(3):354-357.
- [20]黄镭,熊舟翼,熊汉国.磺胺磁性分子印迹聚合物微球的制备及特性研究[J].肉类研究,2010(4):35-38.
- [21]张晓旭,游惠珍,李伟,等.分子印迹材料的制备与应用[J].广州化工,2012,40(9):6-10.
- [22]毛艳丽,罗世田,吴俊峰,等.高岭土磁性复合材料表面印迹聚合物选择性吸附分离环丙沙星[J].无机化学学报,2017,33(1):81-88.
- [23]唐祝兴,艾美美,薛君.磁性分子印迹材料的制备及其对Cu(II)的吸附性能研究[J].沈阳理工大学学报,2016,35(3):96-101.
- [18]赵丽.三种重金属单抗的制备与抗体基因序列分析及其免疫检测方法的建立[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.
- [19]刘文迪.重金属铜单克隆抗体的制备及免疫检测方法的建立[D].吉林大学,2012.
- [20] Kong T, Li X B, Liu G W, et al. Preparation of specific monoclonal antibodies against chelated copper ions [J]. Biological Trace Element Research, 2012, 145(3): 388-395.
- [21]段玉春,程作用.双功能螯合剂的研究进展[J].广东化工,2013,40(12):103-104.
- [22] Svanedal I, Boija S, Almesåker A, et al. Metal ion coordination, conditional stability constants, and solution behavior of chelating surfactant metal complexes [J]. Langmuir, 2014, 30(16):4605-4612.

(上接第248页)

Trace Element Research, 2012, 145(3): 388-395.

[14] 2006 G B. 生活饮用水卫生标准[S], 2006.

[15] Blake R C, Pavlov A R, Khosraviani M, et al. Novel monoclonal antibodies with specificity for chelated uranium(VI): isolation and binding properties [J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(5): 1125-1136.

[16] Delehanty J B, Jones R M, Bishop T C, et al. Identification of important residues in metal-chelate recognition by monoclonal antibodies [J]. Biochemistry, 2003, 42(48): 14173-14183.

[17] Zhu X, Hu B, Lou Y, et al. Characterization of monoclonal antibodies for lead-chelate complexes: applications in antibody-based assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13): 4993-4998.