

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.07.012

盐酸可乐定人工抗原的合成及鼠源多抗血清 ELISA 鉴定

Synthesis of artificial antigen and ELISA identification of mouse polyclonal antiserum against clonidine hydrochloride

王 耀¹ 曹金博^{2,3} 李铁梅⁴ 庞杏豪¹ 胡晓飞²

WANG Yao¹ CAO Jin-bo^{2,3} LI Tie-mei⁴ PANG Xing-hao¹ HU Xiao-fei²

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 3. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 咸阳 712100; 4. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

(1. Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China; 2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China; 3. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Xianyang, Shaanxi 712100, China; 4. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

摘要:目的: 获得敏感性高, 特异性强的新型瘦肉精盐酸可乐定 (Clonidine hydrochloride, CLO) 鼠源多抗血清。方法: 以 CLO 的衍生物盐酸阿可乐定 (Apraclonidine hydrochloride, ACLO) 为半抗原, 采用戊二醛法将 ACLO 分别与牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 和鸡卵清蛋白 (Ovalbumin, OVA) 偶联, 合成免疫抗原 CLO-BSA 和包被抗原 CLO-OVA。采用紫外扫描和聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定其偶联效果后, 免疫 BALB/c 小鼠, 制备多抗血清。利用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 鉴定其免疫学特性。结果: 合成的人工抗原免疫效果较好, 所获小鼠多抗血清效价均达到 1 : 12 800 以上, 其中 3 号小鼠敏感性最好, 半数抑制质量浓度 (IC₅₀) 为 82.75 ng/mL, 与其他几种常见的瘦肉精类药物交叉反应率均小于 0.9%, 特异性良好。结论: 通过戊二醛法成功合成了高免疫原性的 CLO 人工抗原, 并获得敏感性高, 特异性强的 CLO 鼠源多抗血清。

关键词: 盐酸可乐定; 人工抗原; 多抗血清; ELISA

Abstract: Objective: The aim of this study was to obtain highly sensitive and specific mouse polyclonal antiserum of Clonidine hydrochloride (CLO). Methods: Apraclonidine (ACLO), a derivative of CLO, was acted as hapten of clonidine (CLO) to synthesize immune antigen CLO-BSA and envelope antigen CLO-OVA by glutaraldehyde (GA). The coupling effect was identified by ultraviolet scanning and polyacrylamide gel electrophoresis. Then, BALB/c mice were immunized and their immunological characteristics were identified by indirect ELISA and indirect competitive ELISA. Results: The titer of polyclonal antiserum of all mice were higher than 1 : 12 800, and the polyclonal antiserum of No.3 mouse has the best sensitivity, the IC₅₀ was 82.75 ng/mL, and the cross reaction rate with several other common clenbuterol was all less than 0.9%. Conclusion: In this study, successfully synthesized the effective artificial antigen of CLO by GA method, and obtained the mouse polyclonal antibody of CLO with high sensitivity and specificity.

Keywords: clonidine hydrochloride; artificial antigen; polyclonal antiserum; ELISA

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31702218); 国家级大学生创新创业训练计划 (编号: 202010464024); 河南省青年人才托举工程 (编号: 2020HYTP029); 河南省动物免疫学重点实验室开放课题 (编号: PKLAI20170603); 河南省科技攻关 (编号: 182102110445); 河南省自然科学基金 (编号: 182300410038); 河南省农业科学院科技发展专项资金 (编号: 2019CY04)

作者简介: 王耀, 男, 河南科技大学副教授, 博士。

通信作者: 胡晓飞 (1972—), 男, 河南省农业科学院研究员, 博士。
E-mail: huxf1972@126.com

收稿日期: 2020-06-14

盐酸可乐定 (clonidine hydrochloride, CLO) 属于中枢神经系统肾上腺素 α_2 受体激动剂, 分子式为 $C_9H_{10}Cl_3N_3$, 分子量为 266, 分子结构式如图 1(a) 所示。临床上 CLO 在治疗高血压、心律失常等方面有较好的疗效, 同时与中枢神经抑制药、降压药合用具有协同促进作用^[1-3]。CLO 属于咪唑啉的衍生物, 临床上可显著促进激素水平升高,

将其添加在动物饲料中可促进禽畜垂体分泌生长激素,进而促进生长,提高瘦肉率^[4-6],是一种新型的瘦肉精类药物。CLO 的毒副作用较大,食用一定量含 CLO 残留的动物源性食品后,将会出现口干、嗜睡、头痛、恶心、呕吐、便秘、心悸等中毒症状,严重者危及生命^[7-8]。农业部 1519 号公告中已经严令禁止在动物饲料及饮水中添加 CLO,但仍有不法分子被经济利益驱动,在禽畜养殖中为提高动物生长速度和瘦肉率违法使用 CLO,甚至在休药期为掩盖动物病情而继续用药,导致了 CLO 在动物体内大量残留,对人身健康产生极大威胁。

目前,高效液相色谱法^[9]、气相色谱法^[10]、高效液相色谱—串联质谱法^[11-12]等仪器检测方法已被应用于 CLO 药物残留检测,此类检测方法虽然在灵敏度、准确度和假阴性率方面具有很大的优势,但样品检测需要昂贵的仪器设备和专业的操作人员,且样品前处理操作较为复杂,不适合运输中易破坏的样品和现场高通量样品的快速筛查。而近年来免疫分析检测技术发展迅速,尤其是基于抗原抗体特异性结合的经典酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),不仅操作简单、快速,而且灵敏度高,特异性强,可解决仪器检测方法的局限,实现现场样品的高通量快速筛查^[13-14]。而基于免疫分析技术和胶体金示踪技术发展而来的胶体金免疫层析检测试纸(Colloidal gold immunochromatographic strip, ICS)可在 5~10 min 内实现样品肉眼可见的快速检测,目前,ICS 检测方法已被广泛用于各种农兽药、过敏原等残留检测。ELISA 和 ICS 检测方法的关键在于高亲和力单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb)的制备,而高亲和力 mAb 制备的关键在于高免疫原性人工抗原的合成。目前关于 CLO 的残留检测研究多为色谱检测方法,而免疫学检测方法研究较少,李丹妮等^[15]基于兔抗 CLO 多克隆抗体建立了检测 CLO 的 ELISA 检测方法,但该方法在 CLO 人工抗原合成过程中,采用琥珀酸酐对 CLO 半抗原改造温度较高,条件不易控制,过程较为复杂。目前,关于 CLO-mAb 的制备以及基于 CLO-mAb 建立的用于检测 CLO 残留的 ELISA 和 ICS 检测方法的研究较少。CLO 分子结构上无可用于偶连载体蛋白的活泼基团,试验拟基于结构类似物的交叉反应性原理,以 CLO 的衍生物盐酸阿可乐定(Apraclonidine hydrochloride, ACLO)[结构式如图 1(b)所示]为半抗原,建立一种新的

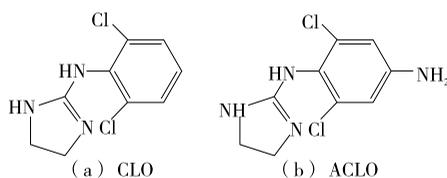


图 1 CLO 和 ACLO 分子结构式

Figure 1 Chemical structure of CLO and ACLO

人工抗原偶联方法(戊二醛法)一步合成 CLO 人工抗原,以期为高亲和力 CLO-mAb 的制备奠定良好的基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

ACLO:纯度 $\geq 98\%$,中国食品药品鉴定研究所;

CLO、苯乙醇胺 A(PA)、巴氯芬(BA)、沙丁胺醇(SAL)、莱克多巴胺(RAC):纯度 $\geq 99\%$,美国 Sigma 公司;

弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)、牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA):纯度 $\geq 99\%$,美国 Sigma 公司;

戊二醛(GA):纯度 50%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

羊抗鼠酶标二抗(GaMIgG-HRP);美国 Jackson Immuno Research 公司;

稀释液(PBS)、包被液(CBS)、洗涤液(含 0.5%吐温-20 的 PBS 溶液, PBST)、封闭液(含 5%脱脂奶粉的 PBST 溶液)、显色液(TMB)、终止液(2 mol/L 的稀硫酸)等;河南省农业科学院动物免疫学重点实验室自制。

1.1.2 仪器与设备

电子天平:BSA224S 型,德国 Sartorius 公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,美国 Thermo Scientific 公司;

振荡器:Vortex2 型,艾卡仪器设备有限公司;

高速均质乳化机:T8.10 型,艾卡仪器设备有限公司;

控温磁力搅拌器:SZCL-2 型,巩义市予华仪器有限责任公司;

恒温培养箱:HPX-9052MBE 型,上海博迅实业有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-5100H 型,美国 Thermo Fisher 公司;

电泳仪:DYY-6C 型,大连捷迈科贸有限公司;

凝胶成像仪:ChemiDoc™ XRS⁺ 型,美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 试验动物

BALB/c 小鼠:6~8 周龄 SPF 级,河南省实验动物中心。

1.2 方 法

1.2.1 人工抗原合成 采用 GA 一步法合成 CLO 人工抗原^[16],其中免疫抗原(CLO-BSA)合成路线图如图 2 所示。称取 3 mg ACLO 溶于 0.5 mL 0.1 mol/mL 的稀 HCl 溶液(A 液),2.5 mg BSA 溶于 1 mL CBS 缓冲液(B 液),将 A 液逐滴滴加到 B 液中,搅拌均匀。然后向混合液中滴加 25%的 GA 溶液 2.6 μ L,室温条件避光偶联 4 h。反应结束后,将反应液转移到透析袋中,4 $^{\circ}$ C 条件下

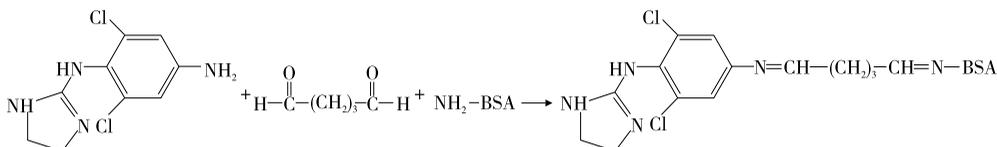


图 2 CLO-BSA 人工抗原合成路线

Figure 2 The synthetic route of artificial antigen CLO-BSA

用 PBS 透析 3 d, 透析结束后, 离心去除沉淀, 上清保存于 -20°C 备用。包被抗原(CLO-OVA)合成方法同上。

1.2.2 人工抗原鉴定

(1) 紫外扫描鉴定: 采用紫外扫描法鉴定 CLO 人工抗原偶联效果, 具体操作为: 用 PBS 缓冲液配置浓度一致的 CLO-BSA、CLO 标准品和 BSA 稀释液, 然后在 $220\sim 350\text{ nm}$ 波长范围内, 利用紫外—可见分光光度计分别扫描各稀释液, 通过分析紫外吸收光谱中人工抗原特征吸收峰特征及相对 CLO 标品和 BSA 载体变化, 判断偶联效果。

(2) SDS-PAGE 鉴定: 参照文献[17]配置电泳所需 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶, 选择浓缩胶和分离胶电压分别为 60, 90 V, 上样量为 $10\ \mu\text{L}$ (含人工抗原 $5\ \mu\text{g}$)。跑胶结束后用考马斯亮蓝染色液染色 $3\sim 4\text{ h}$, 脱色液脱色 6 h , 最后用凝胶成像仪扫描拍照, 根据电泳条带位置差异判断偶联效果。

1.2.3 鼠源多抗血清的制备与鉴定 选择 4 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 采用背部皮下注射方法进行免疫。首免为基础免疫, 将免疫抗原用无菌 PBS 稀释后与等体积 FCA 混合, 乳化剂充分乳化至乳白色且在水中无明显扩散现象时进行免疫, 免疫剂量为 $200\ \mu\text{L}/\text{只}$ (含 $30\ \mu\text{g}$ CLO-BSA)。首免 3 周后, 进行加强免疫, 其中免疫佐剂 FCA 用 FIA 代替, 在第 4 次加强免疫 10 d 后断尾采血, 用 CLO-OVA 包被 ELISA 板鉴定多抗血清效价、敏感性和特异性。

(1) 鼠源多抗血清效价测定: 采用间接 ELISA (i-ELISA) 方法[18]测定 CLO 多抗血清效价。具体操作为: 用 CBS 包被缓冲液将 CLO-OVA 稀释成 $1\ \text{mg}/\text{mL}$ 的稀释液, 每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 ELISA 板中, 4°C 进行过夜包被, 然后用 PBST 洗涤液洗板 4 次, 甩干孔内液体后每孔加入 $250\ \mu\text{L}$ 封闭液, 37°C 孵育 1 h , PBST 洗板甩干后于 4°C 保存备用。检测时取 CLO-OVA 包被好的 ELISA 板, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ PBS 铺底, 首孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 小鼠多抗血清, 倍比稀释至倒数第二孔 (阳性孔), 最后一孔不加血清设为空白对照 (共 12 个孔), 37°C 孵育 $15\ \text{min}$ 后用 PBST 洗板。甩干孔内液体后, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 GaMIgG-HRP 稀释液 (封闭液稀释 1 000 倍), 37°C 孵育 $30\ \text{min}$ 后用 PBST 洗板、甩干。然后每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 显色液, 室温条件下避光显色 $10\ \text{min}$, 最后每孔加

入 $100\ \mu\text{L}$ 终止液, 马上在酶标仪中读取 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值。阳性判定标准为: 待测孔 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值大于空白孔 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值的 2.1 倍。以阳性孔最小 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值所对应的多抗血清稀释倍数作为血清效价。

(2) 鼠源多抗血清敏感性鉴定: 采用间接竞争 ELISA (ic-ELISA) 方法[19]鉴定 CLO 多抗血清敏感性。具体操作为: 取 CLO-OVA 包被的 ELISA 板, 将 CLO 标准品用 PBS 倍比稀释至不同的质量浓度 ($500.000, 250.000, 125.000, 62.500, 31.250, 15.625, 7.813, 3.906, 1.953, 0.977, 0.000\ \text{ng}/\text{mL}$), 每孔 $100\ \mu\text{L}$ 加入 ELISA 板中, 最后一孔加入 $100\ \mu\text{L}$ PBS (空白对照), 然后每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 一定稀释度的 CLO 多抗血清 (效价测定时 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 为 1.2 左右) 至倒数第二孔, 37°C 孵育 $15\ \text{min}$ 。其他操作步骤与效价测定相同。绘制多抗血清对 CLO 的标准抑制曲线时, 以 B/B_0 为纵坐标 (B 和 B_0 分别为 CLO 阳性孔和 CLO 质量浓度为 0 时的 $\text{OD}_{450\ \text{nm}}$ 值), 以 CLO 质量浓度的对数值为横坐标。最后由标准曲线回归方程计算多抗血清对 CLO 的半数抑制浓度 (IC_{50}), 并以此来评价多抗血清的敏感性。

(3) 鼠源多抗血清特异性鉴定: 选择几种常见的瘦肉精类药物 (PA、BA、SAL、RAC) 作为竞争物, 利用 ic-ELISA 鉴定多抗血清的特异性, 以交叉反应率 (CR) 来评价多抗血清特异性, CR 越低说明特异性越强[20]。

1.3 数据处理

对所得的数据利用 Graphpad Prism 8.0 进行处理, 对分子结构式及合成路线图用 ChemDraw Pro 18.0 进行绘制。

2 结果与分析

2.1 人工抗原鉴定

2.1.1 UV 鉴定 CLO 为小分子半抗原, 单独不具备免疫原性, 无法直接刺激机体产生免疫应答反应, 而通过与大分子载体蛋白 (BSA、OVA 等) 偶联合成的人工抗原后则可获得免疫原性。CLO 分子上无可直接用于偶联的活性基团, 试验以苯环 4 位上引入胺基的 CLO 的衍生物 ACLO 为半抗原, 采用 GA 一步法将 ACLO 与载体蛋白偶联合成新的 CLO 人工抗原, 反应条件温和, 操作简单。同时为最大程度地避免自连反应的发生, 严格控制各反应物摩尔比 ($n_{\text{ACLO}} : n_{\text{BSA}} : n_{\text{GA}} = 1 : 1 : 1$)。然后利用

UV 法对合成的人工抗原进行初步鉴定,结果如图 3 所示,BSA、OVA 的特征吸收峰均出现在 280 nm 处左右, CLO 在 270 nm 处出现特征吸收峰,CLO-BSA 在 270 nm 处左右出现特征吸收峰,相比载体蛋白发生明显偏移,相比 CLO 略发生偏移。CLO-OVA 在 260 nm 处出现特征吸收峰,相比载体蛋白和 CLO 均发生明显偏移。特征吸收峰的变化是由于分子内特征基团变化引起的,即 ACLO 与载体蛋白偶联导致原有基团发生变化,也间接证明人工抗原偶联成功。

2.1.2 SDS-PAGE 鉴定 如图 4 所示,BSA 在 63 kDa 处出现电泳条带,而 CLO-BSA 的电泳条带相比 BSA 略微向上,说明其迁移距离小于 BSA,这是由于合成的人工抗原 CLO-BSA 的分子量大于 BSA 的缘故,同样也间接证明 CLO 成功偶联到载体蛋白上。

2.2 多抗血清鉴定

2.2.1 效价 如表 1 所示,免疫的 4 只 BALB/c 小鼠,其多抗血清效价均在 1 : 12 800 以上,3 号小鼠血清效价最高,可达 1 : 25 600 以上,说明免疫抗原在小鼠体内成功刺激机体免疫应答,产生相应抗体。但 CLO 为小分子半

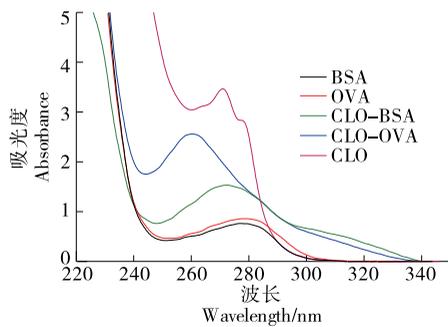


图 3 BSA、OVA、CLO-BSA、CLO-OVA、CLO 紫外扫描图

Figure 3 UV scanning spectrum of BSA, OVA, CLO-BSA, CLO-OVA, CLO

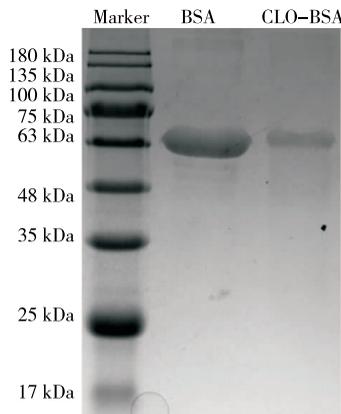


图 4 CLO-BSA 的 SDS-PAGE 鉴定结果

Figure 4 SDS-PAGE identification results of CLO-BSA

表 1 CLO 多抗血清效价测定结果

Table 1 The titers of CLO polyclonal antiserum

多抗血清稀释倍数	1#	2#	3#	4#
200	2.254	2.069	2.662	2.402
400	1.652	1.518	2.329	1.922
800	1.099	0.992	1.708	1.354
1 600	0.716	0.588	1.137	0.894
3 200	0.446	0.359	0.832	0.518
6 400	0.273	0.225	0.512	0.436
12 800	0.236	0.140	0.192	0.191
25 600	0.107	0.089	0.155	0.111
512 000	0.095	0.057	0.097	0.063
空白	0.035	0.036	0.049	0.038

抗原,还需通过敏感性试验进一步验证多抗血清是否能够识别并结合 CLO。

2.2.2 敏感性 如表 2 所示,免疫的 4 只小鼠所获得的多抗血清均可特异性识别并结合 CLO,对其具有显著的抑制作用,其抑制曲线如图 5 所示,4 只小鼠多抗血清对 CLO 的 IC₅₀ 分别为 153.90,94.58,82.75,139.05 ng/mL,其中多抗血清敏感性最好的是 3 号小鼠,多抗血清对 CLO 的标准抑制曲线线性回归方程为 $y = -0.273 6x + 1.024 7$, $R^2 = 0.979 2$,可选择 3 号小鼠作为细胞融合小鼠,后期可通过细胞融合和单克隆抗体筛选技术制备 CLO-mAb。

敏感性鉴定结果最终确证 ACLO 成功偶联到载体蛋白上,获得了较好的免疫原性,暴露的抗原位点成功刺激机体免疫应答,产生了敏感性较好的 CLO 多克隆抗体。

表 2 CLO 多抗血清间接竞争 ELISA 测定结果

Table 2 Indirect competitive ELISA of CLO antiserum (n=3)

CLO 标品质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	1#	2#	3#	4#
500.000	0.367	0.316	0.312	0.523
250.000	0.496	0.324	0.317	0.540
125.000	0.513	0.431	0.354	0.609
62.500	0.574	0.486	0.455	0.702
31.250	0.689	0.587	0.549	0.829
15.625	0.749	0.689	0.631	0.854
7.813	0.843	0.734	0.726	0.987
3.906	0.867	0.759	0.705	0.982
1.953	0.912	0.821	0.859	1.062
0.977	0.956	0.836	0.847	1.122
0.000	1.025	0.926	0.895	1.263
空白	0.068	0.049	0.056	0.059

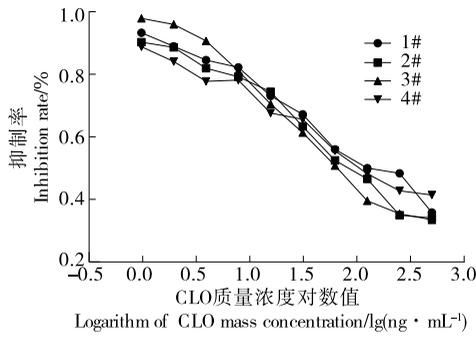


图 5 多抗血清对 CLO 的间接竞争 ELISA 抑制曲线
Figure 5 Inhibitory curve for polyclonal antiserum to CLO by indirect competitive ELISA

2.2.3 特异性 选择敏感性最好的 3 号小鼠多抗血清与其他竞争物进行交叉反应试验,试验结果表明(表 3),多抗血清仅能特异性识别 CLO,与 PA、BA、SAL、RAC 不存在交叉反应,具有较高的特异性。同时也表明,基于此后期所制备的 CLO-mAb,在实际应用于 ELISA、ICA 检测方法时,也将能专一性检测 CLO 残留,有效排除其他瘦肉精类药物的干扰。

表 3 CLO 多抗血清特异性鉴定结果

Table 3 The specificity of CLO polyclonal antiserum

竞争物	IC ₅₀ /(ng · mL ⁻¹)	CR/%
CLO	82.75	100.0
PA	>1.0 × 10 ⁴	<0.9
BA	>1.0 × 10 ⁴	<0.9
SAL	>1.0 × 10 ⁴	<0.9
RAC	>1.0 × 10 ⁴	<0.9

3 结论

盐酸可乐定作为在禽畜养殖中严令禁止添加的一种新型瘦肉精类药物,其免疫学快速检测方法(酶联免疫吸附试验、胶体金免疫层析试纸检测)在实际样品现场高通量快速筛查中发挥着至关重要的作用,酶联免疫吸附试验和胶体金免疫层析试纸检测方法建立的关键在于高免疫原性人工抗原的合成和高亲和力单克隆抗体的制备。试验采用戊二醛一步法成功合成高免疫原性的盐酸可乐定人工抗原,相比前人研究,合成方法更加简单,免疫小鼠后获得的多抗血清效价高达 1 : 25 600 以上,并能特异性识别盐酸可乐定(半数抑制质量浓度为 82.75 ng/mL),与其他几种常见的瘦肉精类药物无交叉反应,具有较高的特异性。基于制备的盐酸可乐定高亲和力单克隆抗体可建立快速检测盐酸可乐定残留的酶联免疫吸附试验和胶体金免疫层析试纸检测方法,为盐酸可乐定残留监控提供有力的技术手段。

参考文献

[1] CHEN Yan-ni, GUO Ling-ling, LIU Li-qiang, et al. An

ultrasensitive immunochromatographic strip for fast screening of twenty-seven sulfonamides in honey and pork liver samples based on a monoclonal antibody [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(37): 8 248-8 255.

[2] FENG Min, SURYOPRABOWO S, TAO Hong, et al. Rapid detection of clonidine and its cross-reactivity with apraclonidine in pig urine using an immunochromatographic test strip[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 1-12.

[3] GUO Meng-yuan, SUN Li, LIU Li-qiang, et al. Ultrasensitive immunochromatographic strip for detection of cyproheptadine[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 941-952.

[4] DENG Xiao-fang, LIU Li-qiang, MA Wen-wei, et al. Development and validation of a sandwich ELISA for quantification of peanut agglutinin (PNA) in foods[J]. Food and Agricultural Immunology, 2012, 23(3): 265-272.

[5] DING Xi, LIU Li-qiang, SONG Shan-shan, et al. Rapid and ultrasensitive detection of 3-amino-2-oxazolidinone in catfish muscle with indirect competitive enzyme-linked immunosorbent and immunochromatographic assays[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017, 28(3): 463-475.

[6] LIU Yang, CAI Meng, WU Wei-ping, et al. Multichannel electroanalytical devices for competitive ELISA of phenylethanolamine A[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2017, 99: 21-27.

[7] 钱国华, 徐玲玲, 张梦玲, 等. 固相萃取—高效液相色谱法测定珍珠降压片中盐酸可乐定的含量[J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(1): 981-982.

QIAN Guo-hua, XU Ling-ling, ZHANG Meng-ling, et al. Content determination of clonidine hydrochloride in Zhenju Jiangya tablets by solid phase extraction-HPLC[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2014, 41(1): 981-982.

[8] 杨挺, 许秀琴, 赵健, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定猪血中盐酸可乐定和盐酸赛庚啉[J]. 肉类研究, 2015, 29(6): 25-28.

YANG Ting, XU Xiu-qin, ZHAO Jian, et al. Determination of clonidine hydrochloride and cyproheptadine hydrochloride in swine blood by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Meat Research, 2015, 29(6): 25-28.

[9] AMEDEO D N, VALERIA A, FRANCO R, et al. UHPLC-MS/MS method with protein precipitation extraction for the simultaneous quantification of ten antihypertensive drugs in human plasma from resistant hypertensive patients[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 129: 535-541.

[10] 杨雪梅, 陈显瑶. 血浆中盐酸可乐定的气相色谱测定法[J]. 药物分析杂志, 1994, 14(2): 24-26.

YANG Xue-mei, CHEN Xian-yao. Determination of clonidine hydrochloride in plasma by gas chromatography [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 1994, 14(2): 24-26.

[11] FREDERICKSEN R J, MAYER K H, GIBBONS L E, et al. Development and content validation of a patient-reported sexual risk measure for use in primary care[J]. Journal of General Internal Medicine, 2018, 33(10): 1 661-1 668.

(下转第 111 页)

参考文献

- [1] 张昌凡. 科技时代的设计再定义[J]. 湖南包装, 2020, 35(1): 4.
ZHANG Chang-fan. Redefinition of design in the age of science and technology[J]. Hunan Packaging, 2020, 35(1): 4.
- [2] 夏俐. 食品包装设计中色彩联想性的表达、强化与发展趋势[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 106-109.
XIA Li. Expression, strengthening and development of color association in food packaging design[J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 106-109.
- [3] 张夫也. 设计的使命和价值[J]. 湖南包装, 2019, 34(2): 4.
ZHANG Fu-ye. The mission and value of design[J]. Hunan Packaging, 2019, 34(2): 4.
- [4] 王超. 传统文化元素在商业化包装设计中的应用研究[J]. 绿色包装, 2020(4): 67-70.
WANG Chao. Research on the application of traditional cultural elements in commercial packaging design[J]. Green Packaging, 2020(4): 67-70.
- [5] 高登明. 二次元文化在乡土食品包装及品牌塑造中的应用[J]. 食品与机械, 2020, 36(5): 123-127.
GAO Deng-ming. The application of quadratic culture in local food packaging and brand building[J]. Food & Machinery, 2020, 36(5): 123-127.
- [6] 蒋妍捷, 张玉山. 基于情景化设计的现代陶瓷茶具研究[J]. 包装工程, 2021, 42(12): 276-282.
JIANG Yan-jie, ZHANG Yu-shan. Modern ceramic teaware based on situational design [J]. Packaging Engineering, 2021, 42(12): 276-282.
- [7] 邱莉莉. 多维趣味表达儿童休闲食品包装设计[J]. 食品与机械, 2020, 36(12): 119-122, 158.
QIU Li-li. Packaging design of children's snack food based on multi-dimensional interesting expression [J]. Food & Machinery, 2020, 36(12): 119-122, 158.
- [8] 向迪雅, 吴志军. 基于情感化理念的食品包装设计研究[J]. 湖南包装, 2020, 35(3): 85-88.
XIANG Di-ya, WU Zhi-jun. Research on food packaging design based on emotional concept [J]. Hunan Packaging, 2020, 35(3): 85-88.
- [9] 薛晓光. 休闲食品包装趣味性的价值及设计原则[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 122-125, 175.
XUE Xiao-guang. The value and design principle of fun in the packaging of leisure foods [J]. Food & Machinery, 2019, 35(11): 122-125, 175.
- [10] 董茜. 浅谈包装设计系列化新理念[J]. 文艺生活旬刊, 2012(4): 47.
DONG Qian. New concept of packaging design serialization [J]. Literary Life Journal, 2012(4): 47.
- [11] 宋志强, 苏胜. 基于情感化的陕西丝路文化文创产品设计研究[J]. 湖南包装, 2020, 35(5): 16-19.
SONG Zhi-qiang, SU Sheng. Research on Shaanxi silk road cultural and creative product design based on emotion [J]. Hunan Packaging, 2020, 35(5): 16-19.
- [12] 刘勃希, 黎英, 陈丽莉. 网购包装减量化研究[J]. 包装工程, 2021, 42(10): 229-235.
LIU Bo-xi, LI Ying, CHEN Li-li. Reduction design of online-shopping packaging [J]. Packaging Engineering, 2021, 42(10): 229-235.
- (上接第 80 页)
- [12] AMEDEO D N, VALERIA A, FRANCO R, et al. UHPLC-MS/MS method with sample dilution to test therapeutic adherence through quantification of ten antihypertensive drugs in urine samples[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 142: 279-285.
- [13] 曹金博, 胡晓飞, 王耀, 等. 土霉素完全抗原的制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. 食品与机械, 2019, 35(9): 77-83.
CAO Jin-bo, HU Xiao-fei, WANG Yao, et al. Preparation of OTC complete antigen and establishment of ELISA detection method [J]. Food & Machinery, 2019, 35(9): 77-83.
- [14] HU Song, LI Dan-hong, HUANG Zhen, et al. Ultra-sensitive method based on time-resolved fluorescence immunoassay for detection of sulfamethazine in raw milk[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 1137-1149.
- [15] 李丹妮, 顾欣, 黄华, 等. 可乐定 ELISA 检测试剂盒的研制及其性能评价[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(8): 40-45.
LI Dan-ni, GU Xin, HUANG Hua, et al. Development and performance measurement of clonidine ELISA test kit [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(8): 40-45.
- [16] 张天杰, 李岩松, 孟星宇, 等. 苋苋完全抗原的合成及其免疫效果评价[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(4): 424-429.
ZHANG Tian-jie, LI Yan-song, MENG Xing-yu, et al. Synthesis and immune effect evaluation of fluoranthene complete antigen [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2015, 37(4): 424-429.
- [17] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 56-60.
GUO Yao-jun. Experimental technique of protein electrophoresis [M]. Beijing: Science Press, 1999: 56-60.
- [18] SUN Ya-ning, YANG Ji-fei, YANG Su-zhen, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk [J]. RSC Advances, 2018, 8(17): 9580-9586.
- [19] 王耀, 胡晓飞, 裴亚峰, 等. 伏马菌素 B1 人工抗原的合成及鼠源多克隆抗血清的制备[J]. 核农学报, 2012, 26(1): 113-117.
WANG Yao, HU Xiao-fei, PEI Ya-feng, et al. Preparation of fumonisin B1 artificial antigen and mouse polyclonal antiserum [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26(1): 113-117.
- [20] CHEN Yan-ni, KONG De-zhao, LIU Li-qiang, et al. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(4): 905-914.