



# 浙江工商大学

## 硕士学位论文

论文题目：抗阿维拉霉素杂交瘤细胞体外培养的优  
化及胶体金检测方法的建立

作者姓名：周露露

学科专业：食品科学与工程

研究方向：食品生物技术

指导教师：陈敏

提交日期： 2022 年 5 月

**Dissertation Submitted to Zhejiang Gongshang University for  
Master's Degree of Engineering**

Optimization of In Vitro Culture of Anti-avilamycin Hybridoma  
Cells and Establishment of Colloidal Gold Detection Method

**Author:**                      **Lulu Zhou**          

**Major:**                      **Food Science and Engineering**          

**Supervisor:**                **Min Chen**          



**May. 2022**

**School of Food Science and Biotechnology  
Engineering, Zhejiang Gongshang University  
Hangzhou, 310018, P. R. China**

## 摘要

阿维拉霉素属于寡糖类抗生素，能维持动物肠道菌群平衡和抑制病菌，尤其对革兰氏阳性菌有明显抑制作用，常作为新型消化促进剂和代谢调节剂添加于饲料中用于防病和促生长。由于抗生素的滥用和误用使得耐药细菌(ARB)和耐药基因(ARGs)快速出现，从而降低了抗生素对人和动物病原体的治疗潜力，同时残留在动物体内的抗生素会通过食物链进入人体，严重危害人体健康。因此欧盟在 2006 年完成了禁止最后四种抗菌促生长剂(莫能菌素，盐霉素，阿维拉霉素和黄霉素)使用的立法。2010 年韩国农林渔业食品部 (MIFAFF) 发布通报，禁用包括阿维拉霉素在内的八种抗生素。2019 年中国发布《食品中兽药最大残留限量》，明确规定了阿维拉霉素代谢物在动物体内各靶组织中的残留限量标准。而在动物体内残留超过限量标准的抗生素，往往是因为滥用、不遵守用药规范等导致过量添加。目前，尚未有报道建立适用于基层的阿维拉霉素快检技术。为规范和引导养殖户合理使用阿维拉霉素，便于检测机构快速初筛，保护畜禽产品的进出口贸易市场，保障食品质量安全，因此需要建立一种检测阿维拉霉素的快速、便捷、灵敏准确的技术。胶体金免疫层析技术是以胶体金颗粒作为示踪标志物应用于抗原抗体检测的一种免疫学分析技术，具有易操作、检测快速、结果可视化等优点，适用于现场检测 and 大规模筛查。而建立胶体金免疫检测技术的关键在于获得高特异性的抗体，它是利用体外培养的杂交瘤细胞通过腹水诱生法来获得。由于体外培养体系中血清成分存在的缺点与风险，因此需要对杂交瘤细胞的体外培养条件进行优化。

本文以本实验室构建的抗阿维拉霉素杂交瘤细胞 2GC8 (保藏编号: CGMCC NO.17485) 为研究对象，优化体外培养条件，并通过腹水诱生获得单抗用于建立胶体金免疫层析技术，实现对阿维拉霉素的快速检测。主要包括以下内容：

### (1) 杂交瘤细胞体外培养条件的优化

以细胞生长情况和抗体分泌情况为考察指标，确定 DMEM/F12 为基础培养基。考察不同血清浓度对细胞的影响，对细胞进行减血清驯化并使其适应 7.5%血清浓度。通过单因素实验初步确定细胞培养基中 6 种营养因子的添加浓度，在此基础上依次应用 Plackett-Burman 设计、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 设计等 3 种实验设计方法，得到添加因子及浓度为：胰岛素 8.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 7.522 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 4.232 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最终获得一种优化的低血清培养基组成，并对其进行模型验证和摇瓶放大。结果表明验

证优化的培养基对细胞生长和抗体分泌效果较好。

## (2) 胶体金免疫层析技术的建立

利用杂交瘤细胞通过小鼠体内腹水诱生获得含目标单抗的腹水，经过辛酸-硫酸铵法和亲和层析柱纯化后，用 SDS-PAGE 鉴定其纯度较高。以 40nm 胶体金颗粒标记纯化后单抗，优化标记条件得到最佳抗体添加浓度为 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，最佳标记 pH 为 7.5，并以此条件制备金标抗体。优化 T 线和 C 线的划膜浓度组合，构建胶体金免疫层析试纸条并对其进行性能评价。通过灵敏度实验得到试纸条检测限为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。利用阿维拉霉素的结构类似物及衍生物测试证实试纸条特异性良好。对多组试纸条进行测试验证重复性较好。说明成功建立了检测阿维拉霉素的胶体金免疫层析技术。

**关键词：**阿维拉霉素；体外培养；单克隆抗体；胶体金免疫层析试纸条

## ABSTRACT

Avilamycin is an oligosaccharide antibiotic, which can maintain the balance of animal intestinal flora and inhibit bacteria, especially having an obvious inhibitory effect on Gram-positive bacteria. It is often added to feed as a new type of digestion promoter and metabolic regulator for disease prevention and growth promotion. Due to the abuse and misuse of antibiotics, the rapid emergence of drug-resistant bacteria (ARBs) and drug-resistant genes (ARGs) reduces the therapeutic potential of antibiotics against human and animal pathogens, while the antibiotics remaining in animals will enter the human body through the food chain, Serious harm to human health. The EU, therefore, completed legislation in 2006 to ban the use of the last four antimicrobial growth promoters (monensin, salinomycin, avilamycin, and flavomycin). In 2010, South Korea's Ministry of Agriculture, Forestry, Fisheries and Food (MIFAFF) issued a notice to ban eight antibiotics including avilamycin. In 2019, China issued the National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits, which stipulated the residue limit standards of avilamycin metabolites in various target tissues in animals. Antibiotics that remain in the animal body exceeding the limit standard are often excessively added due to abuse and non-compliance with drug regulations. At present, there is no report on the establishment of a rapid detection method for avilamycin suitable for the grass-roots level. To standardize and guide farmers to use avilamycin rationally, to facilitate the rapid initial screening of testing institutions, to protect the import and export trade market of livestock and poultry products, and to ensure food quality and safety, it is necessary to establish a fast, convenient, sensitive, and accurate technology for the detection of avilamycin. Colloidal gold immunochromatography technology is an immunological analysis technology that uses colloidal gold particles as tracer markers for antigen and antibody detection. It has the advantages of easy operation, rapid detection, and visualization of results. It is suitable for on-site detection and large-scale screening. The key to establishing colloidal gold immunoassay technology is to obtain highly specific antibodies, which are obtained by using hybridoma cells cultured in vitro by the ascites induction method.

Due to the shortcomings and risks of serum components in the in vitro culture system, it is necessary to optimize the in vitro culture conditions of hybridoma cells.

In this paper, the anti-avilamycin hybridoma cell 2GC8 (Deposit Number: CGMCC NO.17485) constructed in our laboratory is the research object, the in vitro culture conditions were optimized, and the monoclonal antibody was obtained by induction of ascites for the establishment of colloidal gold immunochromatography technology to realize the rapid detection of avilamycin. The main research results are as follows:

#### (1) Optimization of in vitro culture conditions

DMEM/F12 medium was determined as the basal medium based on cell growth and antibody secretion. To investigate the effect of different serum concentrations on cells, cells were acclimated to 7.5% serum concentration by reducing serum acclimation. The addition concentration of 6 nutritional factors in cell culture medium was preliminarily determined by single-factor experiment. On this basis, three Design of Experiments methods, namely Plackett-Burman design, steepest climbing experiment, and Box-Behnken design were applied in turn. The addition factors and concentrations were obtained as follows: insulin 8.197 $\mu$ g/mL, transferrin 7.522 $\mu$ g/mL, ethanolamine 4.232 $\mu$ g/mL, an optimized low serum medium composition was finally obtained, and model validation and shake flask amplification were performed. The results showed that the optimized medium had better effect on cell growth and antibody secretion.

#### (2) Establishment of colloidal gold immunochromatography technology

Hybridoma cells were used to induce ascites in mice to obtain ascites containing the target mAb. After purification by the octanoic acid-ammonium sulfate method and affinity chromatography, the purity was identified by SDS-PAGE. The monoclonal antibody was labeled with 40nm colloidal gold particles, and the labeling conditions were optimized to obtain the optimal antibody concentration of 9  $\mu$ g/mL and the optimal labeling pH of 7.5. Gold-labeled antibodies were prepared under these conditions. The combination of T-line and C-line scribing concentration was optimized, the colloidal gold immunochromatographic test strip was constructed and its performance was evaluated. The detection limit of the test strip was 2 $\mu$ g/mL through the sensitivity experiment. The specificity of the test strip was confirmed

by the test of structural analogs and derivatives of avilamycin. Tests on multiple groups of test strips verified that the repeatability was good. This indicates that the colloidal gold immunochromatographic technique for the detection of avilamycin has been successfully established.

**Keywords:** Avilamycin; In vitro culture; Monoclonal antibody; Colloidal gold immunochromatographic test strip

## 插图目录

图 1.1 阿维拉霉素各组分结构式 .....	2
图 2.1 不同基础培养基中细胞形态 (5d) .....	22
图 2.2 不同基础培养基的细胞生长情况 .....	22
图 2.3 不同血清浓度下各组细胞的生长情况 .....	23
图 2.4 不同血清浓度下细胞覆盖情况 .....	24
图 2.5 不同血清浓度下细胞形态观察 .....	25
图 2.6 胰岛素浓度对细胞生长的影响 .....	26
图 2.7 转铁蛋白浓度对细胞生长的影响 .....	26
图 2.8 乙醇胺浓度对细胞生长的影响 .....	27
图 2.9 BSA 浓度对细胞生长的影响 .....	27
图 2.10 亚硒酸钠浓度对细胞生长的影响 .....	28
图 2.11 谷氨酰胺浓度对细胞生长的影响 .....	28
(a) 胰岛素与转铁蛋白间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图 .....	34
(b) 胰岛素与转铁蛋白间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图 .....	34
图 2.12 胰岛素与转铁蛋白间的交互作用对效价 OD <sub>450</sub> 值的影响 .....	34
(a) 胰岛素与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图 .....	35
(b) 胰岛素与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图 .....	35
图 2.13 胰岛素与乙醇胺间的交互作用对效价 OD <sub>450</sub> 值的影响 .....	35
(a) 转铁蛋白与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图 .....	36
(b) 转铁蛋白与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图 .....	36
图 2.14 转铁蛋白与乙醇胺间的交互作用对效价 OD <sub>450</sub> 值的影响 .....	36
图 2.15 摇瓶条件下细胞增长情况 .....	38
图 3.1 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 图 .....	48
图 3.2 最适标记 pH 的确定 .....	49
图 3.3 不同 K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 添加量条件下的 OD <sub>530</sub> 值 .....	50
图 3.4 最佳抗体标记量的确定 .....	51



图 3.5 不同抗体标记量条件下 OD <sub>530</sub> 值 .....	51
图 3.6 划膜浓度测试 .....	52
图 3.7 试纸条的重复性测试 .....	53
图 3.8 样品中不同浓度阿维拉霉素的检测结果 .....	53
图 3.9 试纸条的特异性测试 .....	54

## 附表目录

表 1.1 食品中阿维拉霉素的 <sup>最大残留限量标准</sup> .....	4
表 2.1 试剂 .....	18
表 2.2 仪器设备 .....	18
表 2.3 营养因子的种类和浓度 .....	20
表 2.4 不同基础培养基的细胞上清效价 OD .....	22
表 2.5 不同血清添加浓度下细胞上清效价 OD .....	23
表 2.6 不同血清浓度下细胞上清效价 OD .....	24
表 2.7 Plackett-Burman 试验参数及水平 .....	29
表 2.8 Plackett-Burman 试验设计及响应值 .....	30
表 2.9 Plackett-Burman 实验的方差分析结果 .....	30
表 2.10 最陡爬坡试验设计及结果 .....	31
表 2.11 Box-Behnken 试验因素及水平 .....	32
表 2.12 Box-Behnken 试验设计及结果 .....	32
表 2.13 Box-Behnken 试验结果方差分析表 .....	33
表 2.14 摇瓶条件下细胞上清效价 OD .....	37
表 3.1 试剂 .....	42
表 3.2 仪器设备 .....	43
表 3.3 单克隆抗纯化结果 .....	49
表 3.4 检测线和质控线划膜浓度的设计 .....	52
表 3.5 试纸条的灵敏度测试 (n=3) .....	53
表 3.6 试纸条特异性测试结果 (n=3) .....	54

## 目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	III
插图目录.....	VI
附表目录.....	VIII
第 1 章 前言.....	1
1.1 阿维拉霉素的研究现状.....	1
1.1.1 阿维拉霉素的结构与性质.....	1
1.1.2 阿维拉霉素的功能与应用.....	3
1.1.3 阿维拉霉素的限量标准与政策.....	4
1.1.4 阿维拉霉素的检测方法与研究进展.....	4
1.2 体外培养.....	7
1.2.1 体内法与体外法.....	7
1.2.2 体外培养的培养基成分.....	7
1.2.3 培养基组分的优化.....	8
1.3 胶体金免疫层析技术的研究进展.....	9
1.3.1 胶体金免疫层析技术的原理.....	9
1.3.2 胶体金免疫层析试纸条的组成与分类.....	10
1.3.3 胶体金免疫层析试纸条的应用.....	10
1.4 研究目的与意义.....	13
1.5 技术路线.....	15
1.6 研究内容.....	16
第 2 章 抗 AVI 杂交瘤细胞体外培养条件的优化.....	17
2.1 实验材料.....	18
2.1.1 实验试剂.....	18
2.1.2 实验材料与仪器.....	18
2.1.3 溶液配制.....	19

2.2	实验方法 .....	19
2.2.1	细胞复苏 .....	19
2.2.2	基础培养基的选择 .....	19
2.2.3	血清添加浓度对杂交瘤细胞的影响 .....	19
2.2.4	细胞减血清驯化 .....	20
2.2.5	低血清培养基的优化 .....	20
2.2.6	摇瓶放大试验 .....	21
2.3	实验结果 .....	22
2.3.1	基础培养基的选择 .....	22
2.3.2	血清添加浓度对细胞的影响 .....	23
2.3.3	细胞减血清驯化结果 .....	24
2.3.4	低血清培养基组分优化结果 .....	25
2.3.5	摇瓶放大试验 .....	37
2.4	本章小结 .....	38
2.4.1	讨论 .....	38
2.4.2	结论 .....	40
第3章	阿维拉霉素胶体金免疫层析试纸法的研究 .....	42
3.1	实验材料 .....	42
3.1.1	实验试剂 .....	42
3.1.2	实验材料与仪器 .....	43
3.1.3	溶液配制 .....	43
3.2	实验方案 .....	44
3.2.1	单克隆抗体的制备 .....	44
3.2.2	单克隆抗体的鉴定-间接 ELISA 法 .....	45
3.2.3	胶体金-抗体偶联物的制备 .....	45
3.2.4	阿维拉霉素胶体金免疫层析条件的优化 .....	46
3.2.5	胶体金免疫试纸条的组装 .....	46
3.2.6	胶体金免疫试纸条的检测过程 .....	47
3.2.7	试纸条的性能评价 .....	47

3.3 实验结果 .....	48
3.3.1 单克隆抗体的鉴定 .....	48
3.3.2 胶体金免疫层析条件的优化 .....	49
3.3.3 T 线和 C 线的划膜浓度的确定 .....	52
3.3.4 试纸条性能评价 .....	52
3.4 本章小结 .....	54
3.4.1 讨论 .....	54
3.4.2 结论 .....	56
第 4 章 结论与展望 .....	57
4.1 结论 .....	57
4.2 创新点 .....	58
4.3 展望 .....	58
参考文献 .....	60
致谢 .....	71
独创性声明 .....	72
关于论文使用授权的说明 .....	72

## 第 1 章 前言

### 1.1 阿维拉霉素的研究现状

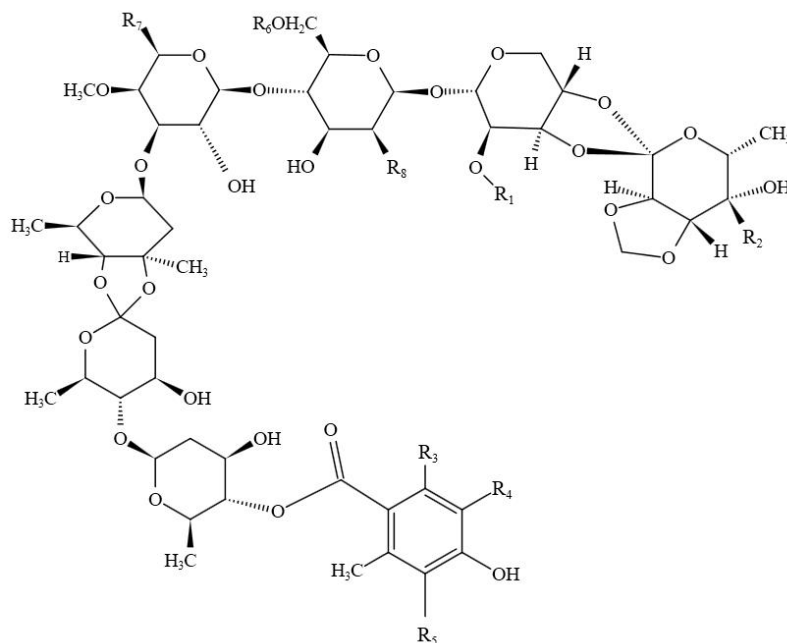
阿维拉霉素 (Avilamycin) 又称卑霉素, 是由绿色产色链霉素菌 (*Streptomyces viridochromogems*, SV) 发酵产生的二氯异扁枝衣酸酯, 属于正糖霉素族的寡糖类抗生素<sup>[1]</sup>。作为一种新型消化促进剂和代谢调节剂, 能维持动物肠道菌群平衡和抑制病菌, 尤其是革兰氏阳性菌, 对猪<sup>[2, 3]</sup>和肉鸡<sup>[4]</sup>有显著的促生长和防病作用。目前, 阿维拉霉素的生产技术被美国礼来公司垄断, 国内尚无厂家生产。因其具有结构独特、安全性高、残留量低、易降解、不存在交叉耐药性、不易被肠道吸收等优点, 在许多国家和地区得到广泛应用, 具有良好的市场前景。

阿维拉霉素分别于 1987 年 (猪用) 和 1990 年 (鸡用) 被欧盟批准列入通用使用标准, 但考虑到抗生素耐药性的发展和抗生素耐药性基因可能从动物到人微生物的转移, 于 2006 年完成对所有作为促生长饲料添加剂的抗生素 (包括阿维拉霉素) 的使用<sup>[5]</sup>; 2005 年我国批准可将阿维拉霉素预混剂用于猪和鸡饲料中, 又于 2015 年作为动物用药物饲料添加剂批准进口, 同时为限制阿维拉霉素的使用, 在 GB31650-2019 食品中兽药最大残留限量中明确规定了其在各靶组织中的残留限量。因此为规范阿维拉霉素作为饲料添加剂的使用, 需要建立相应的检测方法来提供保障。

#### 1.1.1 阿维拉霉素的结构与性质

阿维拉霉素是一种与细胞生长相关联的次级代谢产物<sup>[6]</sup>, 有 A 到 N 共 15 个组分, 主要活性组分为阿维拉霉素 A, 分子式为  $C_{61}H_{88}Cl_2O_{32}$ , 分子量 1404.24; 其次为阿维拉霉素 B, 分子式为  $C_{59}H_{84}Cl_2O_{32}$ , 分子量 1376.19, 其他组分含量低且活性小<sup>[7]</sup>。其分子结构由一分子双氯晚霉素酸分子连接一个七糖链组成。结构式如下图 1.1<sup>[8]</sup>。是唯一一种属于奥尔托索霉素类的饲用促生长素。因其结构独特, 与已知任何抗生素不存在交叉耐药性, 包括氯霉素、四环素、红霉素等以核糖体为靶标的抗生素<sup>[9]</sup>。

阿维拉霉素呈棕褐色粉末，有霉味，熔点为 181°C~182°C，水溶性差，易溶于有机溶剂，在光照和酸性环境条件下能迅速降解，在碱性环境降解速度较慢<sup>[10]</sup>。市售（进口）阿维拉霉素商品多为阿维拉霉素 A 和阿维拉霉素 B 的混合物<sup>[11]</sup>。



Avilamycins	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>
A	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
A'	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
B	COCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
C	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
D <sub>1</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
D <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
E	H	CH(OH)CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
F	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OH	H	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
G	CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
H	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
I	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
J	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
K	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>
L	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CHO	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
M	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
N	COCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH

图 1.1 阿维拉霉素各组分的结构式

Fig.1.1 Chemical structure formula of avilamycin

## 1.1.2 阿维拉霉素的功能与应用

### 1.1.2.1 抑菌机制

阿维拉霉素通过作用于细菌核糖体 A 位点，干扰起始因子 IF2 和 tRNA 的结合<sup>[12]</sup>，细菌核糖体亚基的结合位点跨越 A-tRNA 入口通道，从而通过阻断 A-tRNA 肘部的结合位点来抑制蛋白质合成，是其他已知抗生素不具备的机制<sup>[13]</sup>。在翻译延伸阶段，由于阿维拉霉素结合到核糖体大亚基上时，部分残基会与核糖体 50S 的 A 位发生重叠，导致氨基酰-tRNA 的肘部核苷酸 G53 与 G52 无法正确附着到核糖体 50S 的 A 位上，从而阻断肽链延伸，抑制细菌蛋白质的合成，最终达到抑菌目的<sup>[1]</sup>。

### 1.1.2.2 抑菌能力

阿维拉霉素主要对革兰氏阳性菌有抑菌活性，且活性较高。对杆菌、梭菌、链球菌和葡萄球菌等作用显著，其中包括已对抗生素产生抗性的菌株，如有青霉素抗性的链球菌、甲氧苯青霉素抗性的葡萄球菌和糖肽类抗生素抗性的肠球菌<sup>[14]</sup>。并可通过抑制细菌在宿主黏膜细胞表面的黏附，从而达到预防病菌感染和抑制病菌持续扩散的效果<sup>[15]</sup>。

### 1.1.2.3 阿维拉霉素的应用

#### (1) 肉鸡

阿维拉霉素对肉鸡具有显著的促生长作用，可提高饲料转化率和增重率，改善料肉比；同时起到有效预防和抑制梭菌性肠炎的发生，维持肠道内环境的平衡，减少肠道毒副代谢产物的产生，降低鸡只死亡率。

邹君彪等<sup>[4]</sup>选取罗斯肉鸡在基础日粮中添加阿维拉霉素，研究表明添加阿维拉霉素能够在一定程度上降低肉鸡的死亡率和料重比，提高血清的免疫球蛋白 G 水平和溶菌酶活性，且以 10 mg/kg 添加剂量效果为佳。Rodger 等<sup>[16]</sup>在肉仔鸡饲料中添加阿维拉霉素，发现可以提高鸡只的生长性能，特别是显著提高屠宰率和胸肌的重量。潘淑媛<sup>[17]</sup>在肉鸡饲料中添加阿维拉霉素，证实可显著降低鸡只盲肠产气梭状芽孢杆菌的数量，同时具有改善肉鸡的体增重、料肉比、垫料品质，降低死淘率，提高屠宰率等优点。梁先明等<sup>[18]</sup>研究验证在饲料中添加阿维拉霉素，不但可以提高 14 日龄内肉鸡的增重率和饲



料利用率,降低鸡的死亡率,而且还可以有效预防和控制产气荚膜梭菌引起的肉鸡坏死性肠炎。

## (2) 猪

在饲料中添加阿维拉霉素能有效促进猪的生长和提高抗病力。阿维拉霉素能抑制肠道杆菌鞭毛的生成,减少对肠壁的破坏,从而达到抑制效果,提高猪生产性能。孔祥书等<sup>[19]</sup>通过比较不同抗生素组合对提高生长速度的影响,发现在猪饲料中添加(10%阿维拉霉素 150mg/kg +15%吉它霉素 200mg/kg)有较高的日增重和饲料转化率。郭金玲<sup>[3]</sup>发现在仔猪饲料中添加 30 mg/kg 阿维拉霉素,可以明显提高仔猪生长速度,减少腹泻发生率,提高经济效益。沈顺新等<sup>[20]</sup>通过对比不同抗生素对仔猪的生长影响,发现那西肽组和阿维拉霉素组对仔猪均有明显的促生长效果。

### 1.1.3 阿维拉霉素的限量标准与政策

2020年1月,农业部发布第245号公告,将包括阿维拉霉素预混剂在内的11种抗生素类兽用药列入《兽用处方药品种目录(第三批)》。2019年9月农业农村部发布GB31650-2019食品中兽药最大残留限量,新增了包括阿维拉霉素等兽药的残留限量,以二氯异吡酸(DIA)为残留标志物,见下表1.1。

表 1.1 食品中阿维拉霉素的最大残留限量标准  
Table 1.1 Maximum residue limit of avilamycin in food

动物种类	靶组织	残留限量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
猪/兔	肌肉、脂肪、肾	200
	肝	300
鸡/火鸡(产蛋期禁用)	肌肉、皮+脂、肾	200
	肝	300

### 1.1.4 阿维拉霉素的检测方法与研究进展

目前,国内外对于阿维拉霉素的检测方法大致可分为仪器分析法、微生物法和免疫学测定法,例如有微生物效价测定方法、气相色谱法-质谱联用检测法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、放射性同位素标记法和高效液相色谱-质谱联用检测法(HPLC-MS)等<sup>[21]</sup>,主要采用仪器法进行检测。

#### (1) 高效液相色谱法

高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是以液体为流动相, 经高压输送至色谱柱, 基于各组分对两相分配系数或吸附力的差异, 由此实现样品各组分分离检测。它具有高灵敏度、自动化、高效、分析范围广、色谱柱可反复使用等优点, 但同时存在样品前处理复杂、需要专业人员操作、仪器昂贵等问题, 因此不适用于现场快速检测。魏德宝等<sup>[22]</sup>建立了测定饲料中阿维拉霉素含量的固相萃取-反相高效液相色谱法。阿维拉霉素 A 和 B 分别在 1.0~100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.5~20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度范围内呈良好线性关系, 平均回收率分别为 82.6%~96.6%和 81.4%~99.7%, 在饲料中的定量限分别为 0.800 和 0.400 $\text{mg}/\text{kg}$ , 检测限分别为 0.250 和 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。潘镇涛等<sup>[21]</sup>采用 HPLC 法测定 10%阿维拉霉素预混剂中阿维拉霉素的含量, 得到在 0.1~5 $\text{mg}/\text{mL}$  范围内线性关系良好, 回收率为 98.7%~101.0%。

### (2) 液相色谱-串联质谱法

液相色谱-串联质谱法 (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS) 将液相色谱与质谱相结合实现优势互补, 液相色谱对复杂样品的高分离能力与质谱的准确组分鉴定能力结合, 大幅缩减分析时间, 分析范围广, 分离能力强, 检测限低且使检测结果更加准确<sup>[23]</sup>。但与高效液相色谱法存在类似问题, 例如样品预处理过程复杂、仪器昂贵、检测成本高、操作专业性强等。

2013 年国家农业部发布的 GB29686 《猪可食性组织中阿维拉霉素残留量的测定液相色谱-串联质谱法》中, 在肌肉和脂肪组织中检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 在肝脏和肾脏组织中检测限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Shizuka 等<sup>[24]</sup>使用 LC-MS/MS 测定在猪肌肉、脂肪和肝脏中的阿维拉霉素及其代谢物总残留量, 以二氯异苔酸 (DIA) 作为标志残留物, 回收率范围为 100% -108%, 相对标准偏差 $<6\%$ 。对于所有类型的样品, 基质效应都可以忽略不计。Clare 等<sup>[25]</sup>以二氯异苔酸 (DIA)作为食品中阿维拉霉素残留的标志物残留物, 建立了一种同位素稀释液相色谱-串联质谱法, 通过优化样品净化程序减少基质效应。DIA 在家禽和猪肌肉中回收率范围为 94% -106%, RSD 均 $\leq 11\%$ 。在家禽和猪肌肉的检测限分别为 2.7 和 0.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限分别为 8.3 和 2.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### (3) 气相色谱法

气相色谱法 (Gas chromatography, GC) 是以气体为流动相的色层分离分析方法。具有分离效率高、灵敏度高、选择性好、分析速度快、应用广泛等特点。适用于易挥发有机化合物的定性、定量分析。但在进行直接定性分析时, 必须用已知物质或数据与相应

的色谱峰进行对比, 或与其他方法(如质谱、光谱)联用, 才可获得肯定结果。Formica 等<sup>[26]</sup>开发了可检测猪组织、脂肪、血液、粪便和尿液中阿维拉霉素总残留的气相色谱法。通过碱水解将阿维拉霉素及其代谢物转化为二氯异苔酸(DIA), 后经氯仿提取, 酸化, 二氯甲烷萃取, 硅胶柱纯化后通过电子捕获检测器进行检测。灵敏度达到 0.1mg/kg, 回收率为 85.4%, 变异系数为 9.1%。

#### (4) 质谱法

Amelin 等<sup>[27]</sup>通过基质或表面辅助激光解吸/电离质谱(MALDI/SALDI MS)从各种动物食品和饲料中鉴定和测定多种抗生素残留量。在 MALDI MS 中检测限为 0.01-0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 在 SALDI MS 中为 0.001-0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 信噪比为 4。其中阿维拉霉素的分析范围为 20-1000 mg/kg, 分析时间为 40-50 min。该方法是一种软离子化技术, 具有高灵敏度、高分辨和高准确的特点<sup>[28]</sup>, 同时存在样品前处理操作繁琐、成本高、难以实现高通量分析等缺点。

#### (5) 微生物法

微生物检定法以抗生素对微生物的杀伤力以及抑制指标为衡量标准, 用于测定抗生素效价<sup>[29]</sup>。可分为比浊法、管碟法和稀释法。具有对抗生素抗菌效价的显示直观的特点, 但是整体操作步骤较多, 耗费时间长且对操作人员有一定要求。袁霞<sup>[30]</sup>采用微生物自显影法测定组织中阿维拉霉素含量。通过对肌肉、皮肤和肝脏组织样品加丙酮提取离心, 正己烷脱脂, 二氯甲烷萃取, 固相萃取等操作, 得到最低检测限和最低定量限分别是 0.013 $\mu\text{g}$ 、0.044 $\mu\text{g}$ 。该方法回收率介于 60.9~94.2%之间, 变异系数 $\leq 12.7\%$ , 在 0.05-0.8 $\mu\text{g}$ 浓度范围有良好的线性关系。

#### (6) 酶联免疫法

酶联免疫技术将抗原抗体的特异性免疫反应和酶的催化作用相结合, 具有高灵敏度、操作简单快速、特异性强等特点, 广泛应用于违禁食品添加剂、农兽药残留、生物毒素和环境毒素的检测。Zhou 等<sup>[31]</sup>开发了一种基于抗阿维拉霉素单克隆抗体的间接竞争酶联免疫技术检测饲料中阿维拉霉素的含量。该方法的  $\text{IC}_{50}$  为 7.44 ng/mL, 检测限为 0.21ng/mL。在猪饲料和鸡饲料中的检出限分别为 1.86  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 2.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 平均回收率为 74.7~105.4%, 变异系数 $< 11\%$ 。并通过 HPLC 进行验证, 良好的相关系数( $R^2=0.9818$ )证明该方法的可靠性。

## 1.2 体外培养

### 1.2.1 体内法与体外法

建立胶体金免疫检测技术的关键之一在于单抗的品质，因此单抗的制备方式尤为关注。最早的单抗制备技术是由英国科学家 Milstein 和 Kohler 于 1975 年发明的杂交瘤技术，它将能分泌抗体的 B 淋巴细胞与能无限增殖的肿瘤细胞相融合，获得同时具备这 2 种性状的杂交瘤细胞，由此获得目标抗体<sup>[32]</sup>。目前单抗制备技术有鼠杂交瘤技术、噬菌体展示技术、转基因小鼠技术和新兴的单细胞逆转录 PCR 技术<sup>[33]</sup>。

但目前实验室常用的动物源单抗的制备方式，仍是基于杂交瘤技术的制备方式，可分为体内法和体外法。体内法就是将性状稳定的杂交瘤细胞注入小鼠腹腔内进行培养，数天后可获取含高浓度单抗的腹水<sup>[34]</sup>。该方法方便快捷、抗体浓度高、产量大、无需培养基等成本；但存在批次间差异大、易引起外源性污染、难以大规模推广、质量难以控制等问题。体外法是将杂交瘤细胞置于一定配比的培养基中培养，一段时间后提取纯化细胞上清得到目标单抗。该方法有效控制了单抗的质量，减小批次差异，有利于实现大规模生产单抗。

### 1.2.2 体外培养的培养基成分

细胞培养基是通过模拟细胞在体内的生长环境而经过反复试验筛选组分配比而成的培养基，是维持细胞性状和促进增殖的重要基础。常用的培养基主要由血清和基础培养基组成，外加抗菌物质和谷氨酰胺。基础培养基一般由葡萄糖、氨基酸、无机盐、维生素和其他辅助因子等组合而成，是维持细胞生长代谢必不可少的物质<sup>[35]</sup>。血清是指在血浆中去除纤维蛋白原而分离出的一种成分十分复杂的混合物<sup>[36]</sup>，主要使用牛血清进行细胞培养。血清中富含细胞生长所必需的营养物质，包括生长因子、激素、蛋白质、维生素、微量元素、脂肪、无机盐等物质。

血清的主要功能有：（1）提供必需的营养物质，促进细胞生长。如氨基酸、维生素、微量元素等；（2）提供激素和生长因子，促进细胞增殖分化。如胰岛素、固醇激素、表皮生长因子、成纤维细胞生长因子等<sup>[37]</sup>。（3）提供促伸展和接触因子，使细胞贴壁免受机械损伤。（4）提供结合蛋白，能保护细胞不受机械损伤和调节渗透压，可

与激素、生长因子、维生素和脂类结合,从而增加细胞活性<sup>[36]</sup>。如白蛋白、转铁蛋白等。

(5) 提供蛋白酶抑制剂,保护细胞膜免受胰蛋白酶损伤。(6) 抵抗由于 pH 变化、重金属离子的影响、蛋白水解活性物质和细菌内毒素等所引起的毒性效应<sup>[38]</sup>。

细胞培养使用血清存在的缺点与风险:(1) 成分复杂,难以明确所有成分的作用及机制<sup>[39]</sup>;(2) 存在污染外源病毒和致病因子的风险<sup>[38]</sup>;(3) 存在批次差异,产品和实验结果的重现性不能保证;(4) 含有细菌毒素、补体、多胺氧化酶等会对细胞的分裂生长产生抑制作用<sup>[40]</sup>;(5) 提取工艺复杂,来源有限,成本高昂。

因此,降低或去除细胞培养基内血清含量,寻找血清替代物已成为细胞培养研究的趋势之一。

### 1.2.3 培养基组分的优化

为降低培养基中的血清浓度,设计并筛选血清替代物作为补充。补充因子,替代血清的同时避免血清所带来的问题,根据需求的必要性可分为必需补充因子和特殊补充因子。必需补充因子是所有细胞株维持生存和增殖所必需的,如转铁蛋白和胰岛素等。特殊补充因子一般有激素、生长因子、维生素、微量元素、酶抑制剂、结合蛋白、贴壁和伸展因子等<sup>[35]</sup>。

激素,目前在培养基中添加的激素可分为多肽类和甾体类,多肽类有生长激素、胰岛素和胰高血糖素等,甾体类有孕酮、氢化可的松和雌二醇等<sup>[41]</sup>。其中胰岛素是最常见且必需的添加物,可以促进氨基酸和葡萄糖的利用以及脂肪酸和糖原的合成,抑制细胞凋亡。

结合蛋白,其中白蛋白和转铁蛋白为主要添加物。白蛋白可作为脂类、金属离子、生长因子、激素和维生素等小分子物质的载体,增加细胞活性;此外还可以缓冲培养基的 pH,中和毒性物质以降低其毒性,作为保护蛋白覆盖在细胞表面使其不受机械损伤<sup>[42]</sup>。转铁蛋白负责转运铁,还能与有毒金属离子和微量元素结合,后者结合后可作为生长因子起促进作用。

维生素,是维持细胞生长的重要活性物质,参与细胞内各种酶活的调节以及调节和控制细胞代谢,可分为水溶性维生素和脂溶性维生素。而细胞生长和扩增所必需的几种维生素已包含在基础培养基中,因此无需额外补充。

微量元素,参与细胞的酶促反应,能消除过氧化物酶和自由基对细胞的损害<sup>[43]</sup>。Se、

Fe、Mn、Zn、Mo、Cu、Ni、Si 等是培养基中常用的微量元素。作用较为显著的元素是硒，硒是谷胱甘肽过氧化物酶的辅因子，能保护细胞免受活性氧的伤害。

脂类，可作为生物合成的前体物质，参与细胞膜的合成和起到储存能量的作用，此外还参与细胞信号传导过程。脂类种类较多，主要有脂肪酸、胆固醇、磷脂等。添加脂类可以促进细胞增殖，如乙醇胺、胆碱和肌醇等都是磷脂酰生物合成的重要前体。乙醇胺作为磷脂酰乙醇胺的前体物质，对细胞膜起到保护作用以及促进细胞的增殖。

### 1.3 胶体金免疫层析技术的研究进展

免疫层析快速检测技术采用胶体金、磁珠、荧光微球等标记抗体作为信号标记物，因其成本低、快速、无需专业人员等优势已成为食品安全检测领域的重要组成部分<sup>[44]</sup>。其中胶体金纳米粒子具有良好的生物相容性、易于阅读、易于制备和功能化等优点，是免疫层析检测技术中传统的标记材料，也是目前市场上免疫层析检测试纸条的主流标记物<sup>[45]</sup>。胶体金免疫层析技术（Gold immunochromatographic assay, GICA）发展于八十年代初，是一种将胶体金、免疫技术和色谱层析技术相结合的快速免疫检测技术<sup>[46]</sup>。待测样品与胶体金标记物在 NC 膜上通过层析作用经过条带发生显色，通过条带颜色的深浅即可直观定性的判定待测样品。因其具有易操作、成本低、结果可视化、分析快速、无需专业检测设备和人员等优点，受到研究人员的关注并广泛应用于致病菌、非法添加物、过敏原、细菌毒素、重金属以及农兽药残留等方面<sup>[47]</sup>，适用于现场检测和大规模筛查。

#### 1.3.1 胶体金免疫层析技术的原理

将胶体金标记物固定于金标垫上，特异性识别待测物质的抗原/抗体与二抗分别固定于 NC 膜上，作为检测线（test line, T 线）和质控线（control line, C 线）。当滴加待测样于样品垫时由于毛细作用而不断前进，经过金标垫后与标记物一起通过 T 线和 C 线，待测物质与标记物因免疫反应被捕获并固定于膜上，最后可通过肉眼或读数仪器识别条带信号得到定性或定量检测结果<sup>[48]</sup>。

### 1.3.2 胶体金免疫层析试纸条的组成与分类

胶体金免疫层析试纸条主要由硝酸纤维素膜、样品垫、结合垫、吸水垫以及聚氯乙烯 (Polyvinylchloride, PVC) 衬板等组成, 膜上包被有两条线分别为检测线和质控线。

胶体金免疫层析技术根据待测物质分子量大小主要分为两种方法, 一是竞争结合法, 适用于小分子物质的检测。二是双抗夹心法, 适用于检测大分子物质, 因为这种方法需要待测抗原提供至少两个抗原表位。

竞争结合法中, T 线上固定抗原并与待测样中的抗原竞争结合金标抗体。若待测样中无抗原, 则金标抗体被 T 线捕获固定而显色, 且 C 线也显色即为阴性结果。若待测样中存在抗原则先与金标抗体结合, T 线上抗原因未结合或结合少量金标抗体而不显色或显色浅, C 线显色, 则为阳性结果。若 C 线不显色则判定该试纸条已失效。

双抗夹心法中, T 线上固定抗体与待测样中的抗原和金标抗体形成的复合物结合。若待测样中无抗原, 则无法被 T 线捕获而不显色, 金标抗体与 C 线上二抗结合而显色, 此为阴性结果。若待测样中有抗原, 则与金标抗体结合形成复合物而被 T 线上抗体捕获显色, 过量金标抗体被 C 线捕获而显色, 此为阳性结果。若 C 线不显色则判定该试纸条已失效<sup>[49]</sup>。

### 1.3.3 胶体金免疫层析试纸条的应用

免疫层析试纸条由 Beggs 等人于 1990 年首次应用人绒毛膜促性腺激素 (Human Chorionic Gonadotrophin, HCG) 的测定<sup>[50]</sup>。随着单抗技术和纳米技术的快速发展, 免疫试纸条技术不断扩大应用范围, 成为快速诊断方面的一项有效手段。

#### (1) 有害微生物

赵越等<sup>[51]</sup>利用重组表位蛋白 map0862-2154c 建立胶体金免疫层析法检测牛副结核病的血清抗体, 对河北省部分牛场采集的 242 份副结核病奶牛血样进行血清抗体检测, 其敏感性、特异性和符合率分别为 91.86%(79/86), 94.23%(147/156)和 93.38%(226/242), 可用于基层检测牛是否患有副结核病。孙涛等<sup>[52]</sup>建立了快速检测鱼类病毒性出血性败血症病毒 (Viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV) 的胶体金免疫层析方法, 检出的病毒量最低限为  $10^{4.0}$ TCID<sub>50</sub>, 无交叉反应, 具有良好的特异性、稳定性、灵敏性和重复性, 在快速辅助检测方面具有推广应用价值。Wu 等<sup>[53]</sup>开发了一种快速、简单、灵敏且用于

检测沙门氏菌的广谱胶体金免疫层析试纸条。目测鼠伤寒沙门氏菌试纸的灵敏度为  $4 \times 10^5$  CFU/mL, 5-15min 即可。可检测 18 种沙门氏菌, 且与另外 14 种食源性病原体无交叉反应。鸡中的鼠伤寒沙门氏菌、副伤寒沙门氏菌 B 和肠沙门氏菌分别在孵育 7h、7h 和 6h 后检测到, 检测限低至 1CFU/mL。

### (2) 生物毒素

何方洋等<sup>[54]</sup>应用竞争抑制免疫层析原理, 研制出检测玉米赤霉烯酮 (ZEN) 的胶体金试纸条, 检测限为 100 $\mu$ g/kg, 灵敏度为 99%, 特异性为 94%, 假阴性率和假阳性率低, 检测时间为 10min, 可用于现场快速检测谷物中的玉米赤霉烯酮。章先等<sup>[55]</sup>针对常见真菌毒素的混合污染情况, 研发了二联胶体金免疫层析试纸条用于检测赭曲霉毒素 A (OTA) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN), 对 OTA 和 ZEN 的检测限分别为 0.625ng/mL 和 1.25ng/mL, 且与谷物和饲料中其它真菌毒素(黄曲霉毒素 B1、伏马毒素 B1、桔青霉毒素、展青霉毒素和呕吐毒素)均无交叉反应, 对天然样本进行检测结果表明该方法与液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 一致性良好, 适用于实际样品中对 OTA 和 ZEN 的同时快速筛查。Bartosh 等<sup>[56]</sup>首次实现了对 ZEA 的高灵敏度免疫色谱分析, 在婴儿食品的水-有机提取物中检测限为 5pg/mL。反应时间为 17min。可通过预先孵育 5 分钟增加特异性抗体与样品抗原相互作用的时间, 同时减少了特定免疫球蛋白的消耗。开发的免疫检测技术能与 HPLC 等昂贵的分析方法竞争, 而不会降低灵敏度。且提出的方法是通用的, 不需要抗体标记, 并且可以很容易地转移到其他低分子量化合物的免疫层析中。

### (3) 农药残留

杨晶祎等<sup>[57]</sup>分别以核酸适体和单克隆抗体为识别探针, 利用金标层析试纸技术建立了快速检测  $Hg^{2+}$  和高效氯氰菊酯农药的方法, 对试纸条的金标抗体浓度、T 线和 C 线的包被浓度及包被量、胶体金标记粒径等条件进行优化, 提高试纸条的灵敏度; 裸眼观察, 检测  $Hg^{2+}$  的试纸条灵敏度为 3 $\mu$ g/mL, 检测高效氯氰菊酯农药的灵敏度可达 0.1 $\mu$ g/mL。Yang 等<sup>[58]</sup>开发了一种用于测定黄瓜中的百菌清 (CTN) 的免疫层析侧流试纸条方法, 目测检出限小于 100ng/mL, 机读检测限为  $91.78 \pm 0.17$  ng/mL, 将含 CTN 的黄瓜样品运用高效液相色谱法进行检测确保试纸条结果的准确性, 检测时间在 5-8min, 适用于筛查黄瓜中是否有 CTN 残留。Xie 等<sup>[59]</sup>首次开发基于胶体金标记单抗的用于检测嘧霉胺的免疫层析试纸条。在最优条件下, 目测截止值为 40ng/mL; 使用便携式条带式阅读器,  $IC_{50}$  和检测限分别为 4.8 和 0.9ng/mL。用于测定水果和蔬菜样品时, 回收率为 83.3-105.7%,



变异系数低于 11.7%。且与 ic-ELISA 和 HPLC-MS/MS 方法相比,得到的结果相似。这些结果表明 ICTS 是一种快速、简单的分析方法适用于食品中嘧霉胺的定量现场监测。

#### (4) 兽药残留

Pei 等<sup>[60]</sup>针对已被禁用的用作药物饲料添加剂的奥拉喹多 (OLA),建立了超灵敏定量金免疫层析法 (GICA) 用于检测动物饲料样品和地表水样品中 OLA,优化条件以提高灵敏度,优化后的  $IC_{50}$  为  $3.35\mu\text{g/L}$  (饲料) 和  $0.35\mu\text{g/L}$  (环境用水),并应用于动物饲料和田间水,然后通过酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行确证,结果一致,可用于快速筛选实际样品中的 OLA。Wu 等<sup>[61]</sup>针对中国牲畜消耗最多的恩诺沙星 (ENR) 和氧氟沙星 (OFL),研发免疫层析侧流试纸条用于同时检测鸡肌肉和猪肉组织中残留的 ENR 和 OFL,检测限估计为  $10\text{ng/mL}$ ,对 47 个样品进行 HPLC 平行分析确证试纸条的有效性,假阴性率和假阳性率均为 0,试纸条在 20min 内可获得结果,适用于半定量或定性的快速检测。Xie 等<sup>[62]</sup>基于金标抗体探针开发免疫层析试纸条用于检测组织样本中 3-氨基-2-噁唑烷酮 (AOZ)。目测截止值可达到  $10\mu\text{g/L}$ 。使用试纸阅读器可得  $IC_{50}$  为  $1.3\mu\text{g/L}$ ,在四种动物组织中的检测限和定量检测限分别为  $0.15\mu\text{g/kg}$  和  $0.31\mu\text{g/kg}$ ,可回收率为 76.3-98.4%,并通过 LC-MS/MS 验证证实一致性良好。

#### (5) 过敏原

Du 等<sup>[63]</sup>建立了一种基于改进的玻璃毛细管中的胶体金免疫层析方法用于检测鱼过敏原小白蛋白 (PV),视觉检测限 (VDL) 和半定量检测限 (LOD) 估计为  $70\text{ng/mL}$  和  $40\text{ng/mL}$ ,该技术已在包括大菱鲆、鱼糜产品和牲畜在内的各种食品中实施和验证,证实了结果的准确性和有效性,可用于现场筛选生物样品中的 PV。刘悦<sup>[64]</sup>针对多种过敏原建立了胶体金免疫层析检测方法,包括单一检测卵转铁蛋白、杏仁过敏原蛋白、花生过敏原蛋白的试纸条,以及在此基础上可同时检测杏仁、花生两种过敏原蛋白的试纸条,卵转铁蛋白、杏仁过敏原蛋白和花生过敏原蛋白的检测限分别为  $15\text{ng/mL}$ 、 $100\text{ng/mL}$  和  $25\text{ng/mL}$ ,杏仁-花生过敏原同步检测试纸条的检测限分别为  $100\text{ng/mL}$  和  $25\text{ng/mL}$ ,试纸条均无交叉反应,10min 内得到检测结果,并通过与 Neogen 商业化过敏原检测试剂盒对试纸条的检测结果的有效性进行对比验证,适用于大量样品的快速筛选。

#### (6) 重金属

赵小旭等<sup>[65]</sup>针对乳制品中可能含有的重金属离子铅建立相应的胶体金免疫层析法,测定乳制品中生鲜乳和酸奶的检出限为  $25\mu\text{g/kg}$ ,成品奶的检出限为  $30\mu\text{g/kg}$ ,奶粉和奶

酪的检出限为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，方法重现性较好，用原子吸收光谱进行确证得到相同结果，适用于乳制品中重金属离子铅的快速检测。Arai 等<sup>[66]</sup>针对镉开发了定量免疫层析检测试剂盒和可视筛选免疫试纸条，试剂盒可以精确测量 Cd 浓度，通过 ICP-OES 对比确证；试纸条可检测浓度超过 0.003mg/L 的 Cd；可用于现场检测 Cd 浓度和筛选糙米中存在的 Cd。Liu 等<sup>[67]</sup>开发、优化和验证用于检测水和血清样品中铬离子(Cr)的免疫层析测定方法。可测量水样中的铬的不同形态（Cr<sup>3+</sup>和 Cr<sup>6+</sup>离子），目测最低检测限为 50.0ng/mL。使用便携式比色横向流动读数器进行定量，得到线性范围为 5-80ng/mL。具有高稳定性，可以在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下储存至少 12 周而不会显著丧失活性。具有良好的 Cr 检测选择性，而其他重金属的干扰可忽略不计。由于成本低、检测时间短（5min），该试纸特别适用于 Cr 污染水样的现场大规模筛查、Cr 暴露的生物监测等诸多现场应用。

#### （7）非法添加物

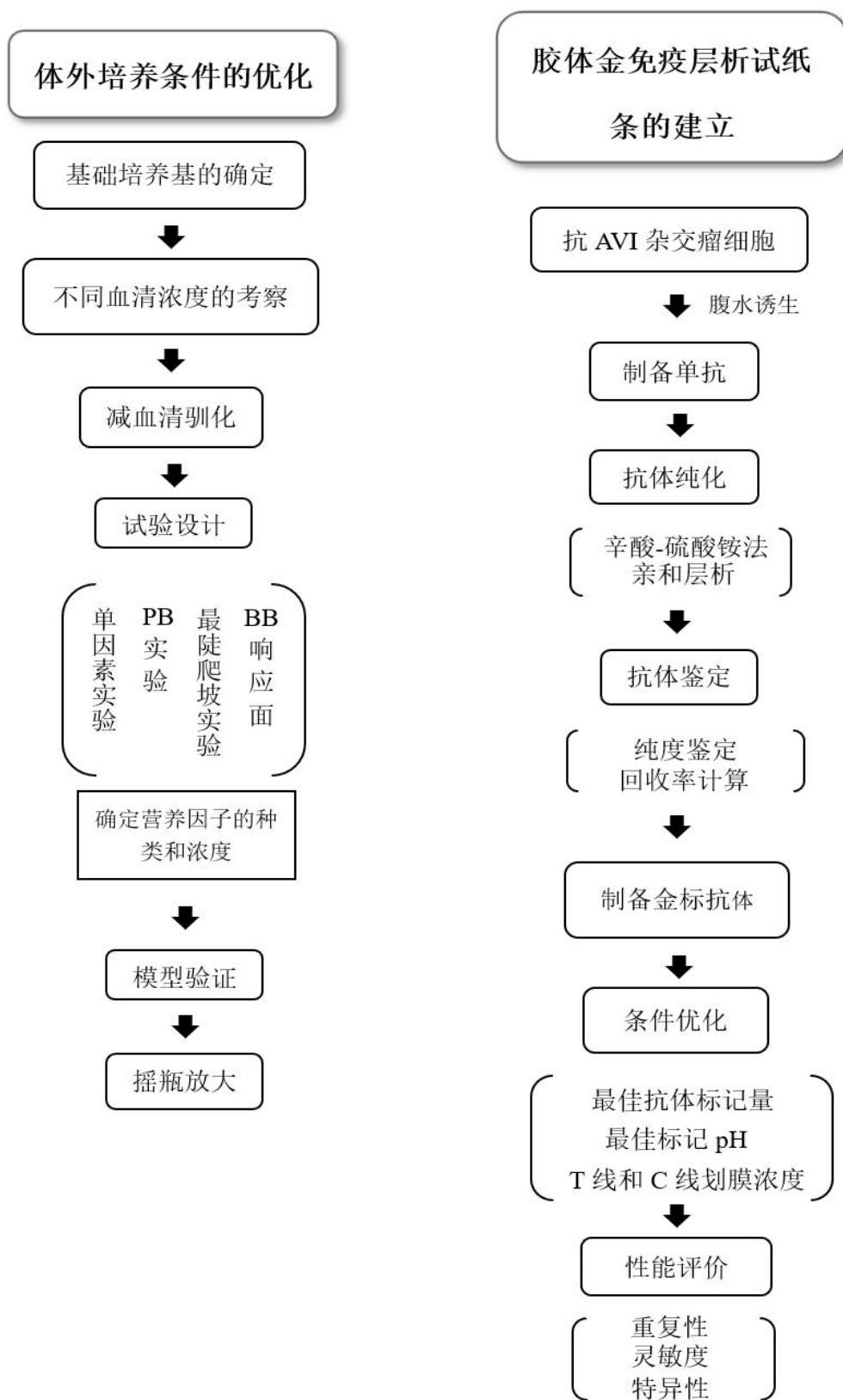
陈华龙等<sup>[68]</sup>对保健食品中违法添加双氯芬酸钠的情况，建立了简便、价廉、灵敏、特异的胶体金免疫层析法，最低检测限为 2.0ng/mL，对 60 个市售样品进行检测并用 HPLC 验证，结果完全吻合，适用于筛查食品中违法添加的双氯芬酸钠。汤轶伟等<sup>[69]</sup>针对牛奶中三聚氰胺残留问题建立相应的免疫层析方法，并对试纸条 T 线抗原包被量、金标抗体用量、二抗稀释倍数等条件进行优化，得到最低检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，读数时间 5min。Xie 等<sup>[70]</sup>针对磺酰脲类（SUs）抗糖尿病药物被非法掺入多种草药茶这一现象，通过设计一种新型半抗原和一种广谱特异性的单克隆抗体，建立胶体金横向流动免疫层析测定法（CG-LFIA）。通过 ELISA 显示出该抗体对 9 种 SU 的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)范围为 0.15-3.25ng/mL。对加标样品的截止值为 3-100ng/mL。经过 LC-MS/MS 证实了 CG-LFIA 的可靠性。

## 1.4 研究目的与意义

中国在 2013 年便是制造和使用抗生素最多的国家之一<sup>[71]</sup>。抗生素的残留也成为一个重要问题，它会加速耐药菌株的产生，通过食物链进入人体并严重危害人体健康，污染生态环境，破坏生态平衡，影响贸易出口<sup>[72]</sup>。而阿维拉霉素作为兽用抗生素，在 GB31650-2019 中明确规定了其代谢物在食品中最大残留限量，由于较为新颖，目前的检测方法多为仪器分析法，存在操作复杂、仪器昂贵、检测成本高等问题，不适合于推广到基层进行现场即时检测。目前鲜有报道关于阿维拉霉素的快速检测技术，因此本研

究旨在建立一种检测阿维拉霉素的胶体金免疫层析技术，检测过程简单快速，适于面向基层推广，方便养殖户的自检和检测机构的快速筛查。单抗制备是建立胶体金免疫技术的关键，本文采用体内法获取大量单抗用于试纸条的研发，同时为降低培养基中血清含量，优化杂交瘤细胞的体外培养条件，运用统计学实验设计法进行系统分析，从而获得满足细胞生长和抗体分泌要求的低血清培养基，同时为以后体外扩大培养及从细胞上清获取单抗作铺垫。

## 1.5 技术路线



## 1.6 研究内容

研究内容主要分为 3 个方面：

### (1) 杂交瘤细胞体外培养条件的优化

依据每日观察细胞在孔板中的覆盖率进行绘图，以此描述细胞的生长情况；利用间接 ELISA 方法测定细胞培养 5 天时的上清效价 OD 值，用于描述细胞的抗体分泌能力。通过上述 2 种方式对基础培养基进行筛选，考察不同血清浓度对细胞的影响，对细胞采用逐级降血清浓度驯化的方式，使其适应低血清浓度培养基。采用试验设计对替代部分血清功能的营养因子进行筛选优化，确定添加种类和添加浓度。先进行单因素实验初步确定各营养因子的添加浓度范围，在此基础上设计 Plackett-Burman 实验，确定其中的显著影响因子。之后进行最陡爬坡实验，选取响应值最大时的浓度条件为后续 Box-Behnken 试验的中心点。通过响应面实验结果拟合回归方程，求得最佳浓度和最大响应值。对最优添加条件进行模型验证及摇瓶放大，验证优化后培养基的效果。

### (2) 获得单克隆抗体

采用腹水诱生法获取含高浓度单克隆抗体的腹水。利用辛酸-硫酸铵法和亲和层析法纯化单抗并用 SDS-PAGE 鉴定纯化效果，计算蛋白回收率。

### (3) 建立胶体金免疫层析试纸条

对抗体标记浓度和标记 pH 进行优化，比色法判定结果。根据优化后条件制备胶体金-抗体偶联物。设计 T 线和 C 线的不同划膜浓度组合，选择 T 线和 C 线条带均清晰的浓度组合。采用上述优化后条件建立胶体金免疫层析试纸条方法，并将各材料依次层叠进行组装。对胶体金免疫试纸条进行性能评价，测试其灵敏度、特异性和重复性。

## 第 2 章 抗 AVI 杂交瘤细胞体外培养条件的优化

体外培养是指将从体内取出的组织或器官通过模拟其体内生理环境，使之生存和生长并维持其结构和功能的方法，包括细胞培养、组织培养和器官培养<sup>[73]</sup>。细胞培养基是通过模拟细胞在体内的生长环境而经过反复试验筛选配比而成的培养基，是维持细胞性状和促进繁殖的重要基础。其中血清作为细胞培养基的重要组成成分，富含细胞生长所必需的营养物质，包括生长因子、脂肪、蛋白质、无机盐、维生素、激素、微量元素等物质。但是由于血清存在成分复杂、作用机制不明确、批次差异、不利于下游的分离纯化、成本高等缺点，因此降低或去除细胞培养基内血清含量，寻找血清替代物已成为细胞培养研究的趋势。因此，对细胞进行驯化并设计低血清培养基有重要意义，为以后从细胞上清获取单抗作铺垫。

本章以本实验室构建的抗阿维拉霉素杂交瘤细胞 2GC8 为研究对象，通过对比不同基础培养基进行筛选，考察不同血清浓度对细胞生长和抗体分泌能力的影响，并对细胞进行减血清驯化使其适应低血清培养条件。通过单因素实验、PB 实验、最陡爬坡实验、BB 响应面等实验设计方法对营养因子的添加种类和浓度进行筛选确定，优化培养基成分。对优化的培养基进行验证并进行摇瓶放大，证实其对细胞生长和抗体分泌的效果。

## 2.1 实验材料

### 2.1.1 实验试剂

表 2.1 试剂  
Table 2.1 Reagents of experiments

名称	公司	规格
胎牛血清	维森特	生化试剂
谷氨酰胺	美国 Sigma	生化试剂
RPMI-1640	天津灏洋华科生物科技	生化试剂
牛血清蛋白	美国 Sigma	生化试剂
DMEM/F12	Thermo Fisher	生化试剂
牛胰岛素	美国 Sigma	生化试剂
转铁蛋白	美国 Sigma	生化试剂
乙醇胺	美国 Sigma	生化试剂
亚硒酸钠	美国 Sigma	生化试剂
辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (HRP-IgG)	Jackson ImmunoResearch Laboratories	生化试剂
胰酶	Thermo Fisher	生化试剂
青霉素-链霉素溶液	上海生工	生化试剂

### 2.1.2 实验材料与仪器

表 2.2 仪器设备  
Table 2.2 Instruments of experiments

名称	型号	厂家
二氧化碳培养箱	BPN-80CH	上海一恒科学仪器公司
倒置显微镜	XD-202	江南永新
液氮罐	YDS-30	成都金凤生物仪器公司
超净台	BCM-1000A	苏净集团公司
离心机	TDZ5-WS	湘仪离心机仪器有限公司
电子天平	AL204	梅特勒-托利多仪器公司
96 孔酶标板	8 联板	厦门怡佳美公司
酶标仪	SPECTRA max M2	美国分子仪器公司, USA
封口膜	ParafilmM	美国 parafilm 公司

### 2.1.3 溶液配制

(1) 0.01mol/L PBS 缓冲液：称取 8.0 g NaCl, 0.2 g KCL, 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 超纯水定容至 1000 mL, pH 7.4。

(2) PBST 洗涤液：在上述 PBS 溶液中加入 0.05% Tween-20, pH 7.4。

(3) 包被缓冲液 CBS: 称取 1.59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.93 g  $\text{NaHCO}_3$ , 超纯水定容至 1000 mL, pH 9.6。

(4) 封闭液：称取 1 g 酪蛋白加入到 100 mL 包被缓冲液。

(5) 抗体稀释液：称取 0.1g 明胶加入到 100 mL 洗涤缓冲液。

(6) 终止液：2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 取浓硫酸 (98%) 33.3mL, 加入到 167mL 蒸馏水中。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 细胞复苏

从液氮罐中取出细胞，放入 37℃ 水浴锅摇晃约 1min, 用吸管吸取细胞转移至含有培养液的 15mL 离心管中, 800 r/min 离心 5min。弃去上清, 用吸管吸取完全培养基于管内对细胞进行重悬。然后转入培养皿中, 置于 37℃、5% $\text{CO}_2$  的培养箱培养, 传 2-3 代, 选择生长旺盛的细胞做后续研究。

### 2.2.2 基础培养基的选择

根据市售的常用基础培养基考察不同基础培养基对细胞生长的影响。选择 RPMI1640、DMEM/F12、1640: DMEM/F12=1: 1 分别作为基础培养基, 在 24 孔细胞培养板中血清浓度为 12.5%, 接种量 10%, 37℃、5% $\text{CO}_2$  的条件下培养, 观察细胞生长覆盖情况和测定上清效价 OD, 每组 3 个平行。

### 2.2.3 血清添加浓度对杂交瘤细胞的影响

在确定了基础培养基的基础上, 考察不同血清添加浓度对细胞生长的影响。接种量 10%时, 基础培养基中分别添加 12.5%、10%、7.5%、5%、2.5%的血清, 在 24 孔细胞



培养板 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的条件下培养，观察细胞生长覆盖情况和测定上清效价 OD 值，每组 3 个平行。

## 2.2.4 细胞减血清驯化

将生长旺盛的细胞按照 10%接种于 24 孔细胞培养板中，培养液为含 12.5%血清的基础培养基，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱培养，细胞长满 80%以上进行传代，待细胞生长稳定后，血清减为 10%进行驯化，逐次递减血清浓度，直至在 7.5%血清浓度条件下稳定生长。

## 2.2.5 低血清培养基的优化

### 2.2.5.1 生长因子单因素实验

在血清驯化和不同基础培养基实验的基础上，设计六种营养物质的添加浓度进行单因素实验，实验设计见表 2.3，以 12.5%血清浓度和不添加生长因子为对照组。每组 3 个平行，将处于对数期、生长状态良好的驯化后细胞接种到含上述培养基的 96 孔细胞培养板中，接种量为 10%，培养体系 200μL，置于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。观察细胞生长覆盖情况及测定上清效价 OD 值。

表 2.3 营养因子的种类和浓度

Table 2.3 Types and concentrations of nutritional factors

生长因子	设计添加浓度
胰岛素溶液	0、2.5、5、7.5、10μg/mL
转铁蛋白溶液	0、5、10、15、20μg/mL
牛血清白蛋白溶液	0、25、50、75、100μg/mL
乙醇胺溶液	0、2.5、5、7.5、10μg/mL
亚硒酸钠溶液	0、2.5、5、7.5、10ng/mL
L-谷氨酰胺	0、50、100、150、200μg/mL

### 2.2.5.2 Plackett-Burman 实验

根据生长因子的单因素实验结果，选择 6 个因素的高低水平，采用 Design-Expert 11

软件中 Plackett-Burman 设计方法对这 6 个因素进行 2 水平设计,筛选出显著因子进行后续优化。

### 2.2.5.3 最陡爬坡实验

根据 Plackett-Burman 设计的结果,设计显著因子的上升路径和步长,进行最陡爬坡试验进一步缩小浓度范围,确定后续 Box-Behnken 响应面实验的中心点,优化培养基配方。

### 2.2.5.4 响应面实验

采用 Box-Behnken 法,对筛选出的关键因子和确定的浓度进一步研究,以获得各因素的最佳水平。3 因素 3 水平的中心组合实验共需 17 组实验,拟合出一个二次多项式方程。该方程可描述响应变量 (Y) 与自变量的经验模型。方程可描述为 (2-1):

$$Y=a_0+a_1A+a_2B+a_3C+a_4AB+a_5AC+a_6BC+a_7A^2+a_8B^2+a_9C^2 \quad (2-1)$$

式中: A、B、C 为由 Plackett-Burman 实验确定对响应值有显著影响的 3 个营养因子, Y 为预测响应值,即细胞上清效价 OD 值,  $a_0$ 、 $a_1$ 、 $a_2$ 、 $a_3$ 、 $a_4$ 、 $a_5$ 、 $a_6$ 、 $a_7$ 、 $a_8$ 、 $a_9$  为方程系数,利用统计软件 Design-Expert 对实验进行回归分析,用 F (Fischer) 检验评价数学模型方程的显著性,方程的拟合性由相关系数  $R^2$  确定。

### 2.2.5.6 模型验证

以响应面优化所得到的最优添加策略重复验证 5 次,根据细胞生长覆盖及上清效价 OD 的平均值与理论值间的差异,评价响应模型的正确性。

## 2.2.6 摇瓶放大试验

采用最优添加组合在摇瓶中进行放大测试,以 12.5%血清培养基和 7.5%血清培养基作为对照,接种量为  $10^5$ /mL,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,培养体积为 10 mL。每日摇瓶取样用血球计数板进行细胞计数,观察细胞生长情况,并测定培养 5 天的细胞上清效价 OD,评价最优添加策略在摇瓶中的效果。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 基础培养基的选择

选择 RPMI1640、DMEM/F12、1640: DMEM/F12=1: 1 分别作为基础培养基进行实验, 观察细胞生长覆盖情况并测定细胞上清效价 OD 值, 分析不同基础培养基对细胞的影响, 结果见图 2.1 和 2.2, 表 2.4。



图 2.1 不同基础培养基中细胞形态 (5d)

Fig. 2.1 Cell morphology in different basal media (5d)

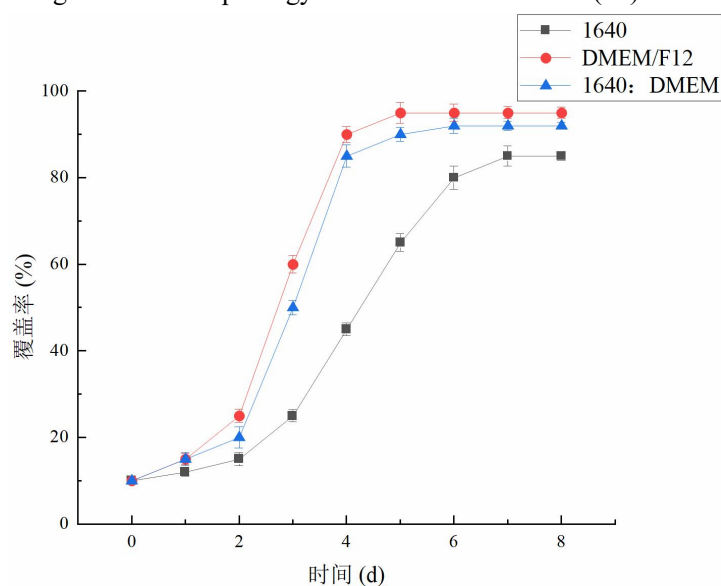


图 2.2 不同基础培养基的细胞生长情况

Fig. 2.2 Cell growth in different basal media

表 2.4 不同基础培养基的细胞上清效价 OD

Table 2.4 Cell supernatant titer OD of different basal medium

基础培养基	RPMI1640	DMEM/F12	RPMI1640+DMEM/F12
OD <sub>450</sub>	0.661±0.086	0.776±0.049	0.740±0.092

由图 2.2 可知, DMEM/F12 和 RPMI1640+DMEM/F12 生长数量差异不显著, 培养 5d 覆盖率均能达到 85%以上。但是 DMEM/F12 组生长状态良好, RPMI1640+DMEM/F12 组培养 5d 部分细胞出现皱缩等状态变差的情况。RPMI1640 组生长略低两者, 且培养 4 天后开始有少部分细胞死亡。由表 2.4 可知, 细胞上清效价 OD 值 DMEM/F12 组最高, RPMI1640+DMEM/F12 组次之, RPMI1640 组最低。可能是不同基础培养基间存在成分差异, 故不同的基础培养基对杂交瘤细胞的生长与抗体表达都有差异甚至是很大的区别。因此, 选择 DMEM/F12 作为基础培养基进行后续实验。

### 2.3.2 血清添加浓度对细胞的影响

在 DMEM/F12 基础培养基中分别添加 12.5%、10%、7.5%、5%、2.5%的血清, 其他条件不变, 考察不同血清添加浓度对细胞的影响, 结果见图 2.3 和表 2.5。

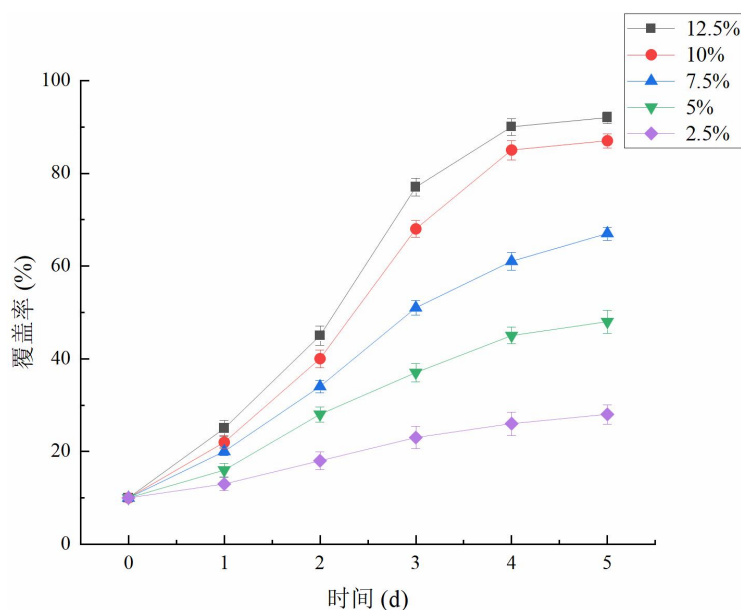


图 2.3 不同血清浓度下各组细胞的生长情况

Fig. 2.3 Growth of cells at different serum concentrations

表 2.5 不同血清添加浓度下细胞上清效价 OD

Table 2.5 OD value of cell supernatant titer at different serum concentrations

血清浓度/%	12.5	10	7.5	5.0	2.5
OD <sub>450</sub>	0.853±0.066	0.812±0.078	0.712±0.058	0.464±0.073	0.399±0.038

由图 2.3 和表 2.5 可知, 血清浓度越高, 细胞生长越快, 细胞上清效价 OD 值也越

高。随着血清的浓度的降低,细胞的生长也变得越来越慢且效价情况也越来越差。可能是血清中存在细胞需要的蛋白、微量元素、生长因子等成分,降低血清浓度后无法完全满足细胞的营养需求,导致对细胞生长和抗体分泌能力产生较大影响。实验说明血清浓度的降低对细胞有明显影响,因此后续对细胞进行减血清驯化,使其适应低血清条件。

### 2.3.3 细胞减血清驯化结果

对细胞进行减血清驯化。经多次传代驯化后,适应的血清浓度由 12.5%逐步降为 7.5%。考察不同血清浓度对驯化后细胞生长和抗体分泌的影响,细胞生长情况及培养 5 天的细胞上清效价 OD 结果见表 2.6 和图 2.5、图 2.6。

表 2.6 不同血清浓度下细胞上清效价 OD  
Table 2.6 Cell supernatant titer OD under different serum concentrations

血清浓度/%	12.5	10	7.5	5.0	2.5
OD <sub>450</sub>	0.870±0.056	0.806±0.098	0.772±0.069	0.564±0.079	0.509±0.086

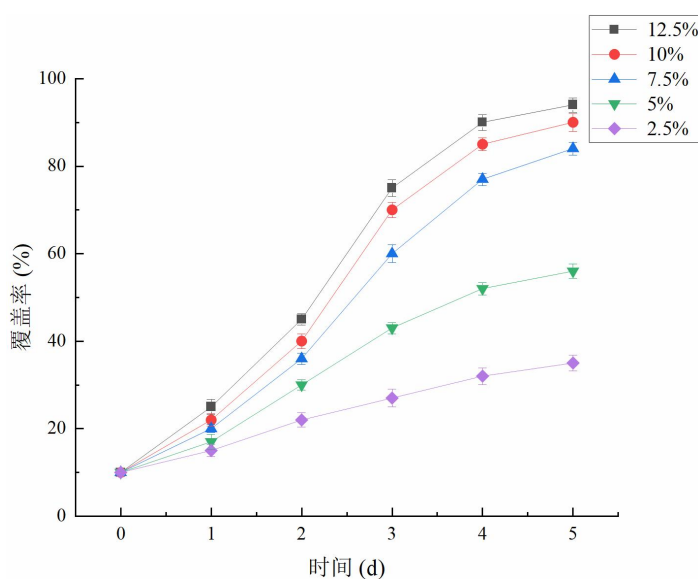


图 2.4 不同血清浓度下细胞覆盖情况

Fig. 2.4 Cell coverage at different serum concentrations

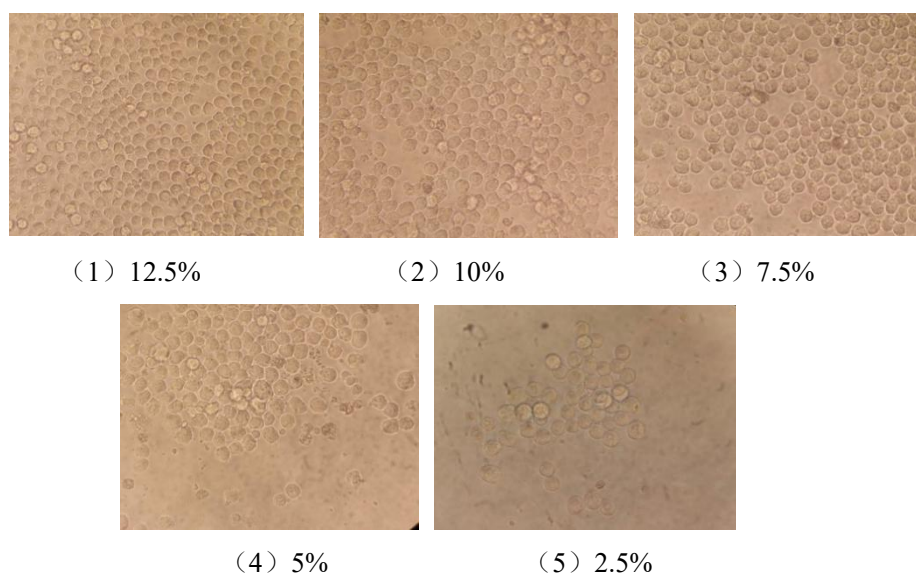


图 2.5 不同血清浓度下细胞形态观察

Fig. 2.5 Observation of cell morphology under different serum concentrations

血清的添加可以促进细胞的生长，同时也存在缺点。血清可能存在污染外源病毒和致病因子的风险；血清中的未知成分及高浓度蛋白对下游分离纯化大大提高了难度；含有细菌毒素、补体、多胺氧化酶等会对细胞的分裂生长产生抑制作用；血清价格昂贵，生产成本高，不利于细胞大规模培养。所以减少血清用量是非常有必要的。由图 2.4 和图 2.5 可知，随着血清浓度的降低细胞生长受到影响，但是细胞经过减血清逐级驯化后，在 7.5% 的血清浓度下覆盖率能达到 80% 以上，与 12.5% 组较为接近，但在上清效价 OD 方面仍有一定差距，后续设计筛选营养因子的添加来弥补。再降低血清浓度至 5% 甚至更低细胞生长明显受到抑制且效价大大减少，可能细胞数量的明显减少影响了抗体的分泌。因此后续选择 7.5% 的血清浓度进行后续研究。

## 2.3.4 低血清培养基组分优化结果

### 2.3.4.1 单因素实验结果

在上述实验确定的血清浓度和基础培养基条件下，根据文献确定 6 种营养物质并设计各物质的添加浓度进行单因素实验。各因素单独添加对细胞生长的影响不同，以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD<sub>450</sub> 值为响应值，确定合适的浓度添加范围，便于后续 PB 实验的进一步优化。

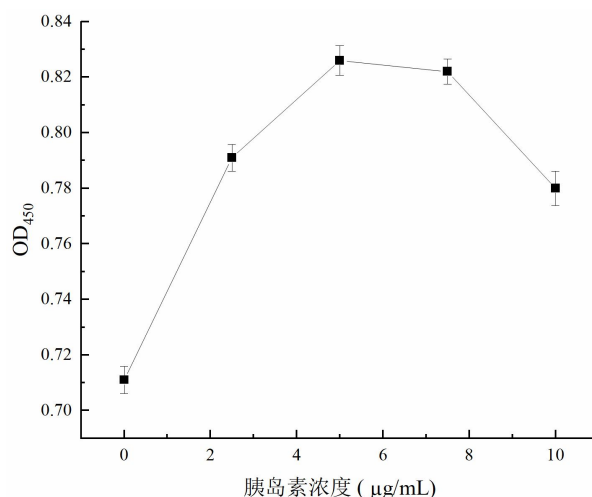


图 2.6 胰岛素浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.6 Effect of insulin concentration on cell growth

胰岛素对细胞具有多效合成作用，可刺激细胞对尿苷和葡萄糖的吸收以合成 RNA、蛋白质和脂质。还能与细胞膜上的胰岛素受体结合而调控细胞内的多种代谢途径，增加脂肪酸和葡萄糖的合成，增加蛋白质和肽的合成，抑制蛋白质分解，对细胞生长起重要作用。由图 2.6 可知，随着胰岛素添加浓度的增加，效价 OD<sub>450</sub> 值总体呈现先上升后下降的趋势，在 5μg/mL 时达到最高，与其他组存在较明显差异，且据相关文献报道胰岛素最佳添加浓度为 1~10μg/mL。因此选定以 5μg/mL 为中心，0~10μg/mL 为后续 PB 试验的浓度范围。

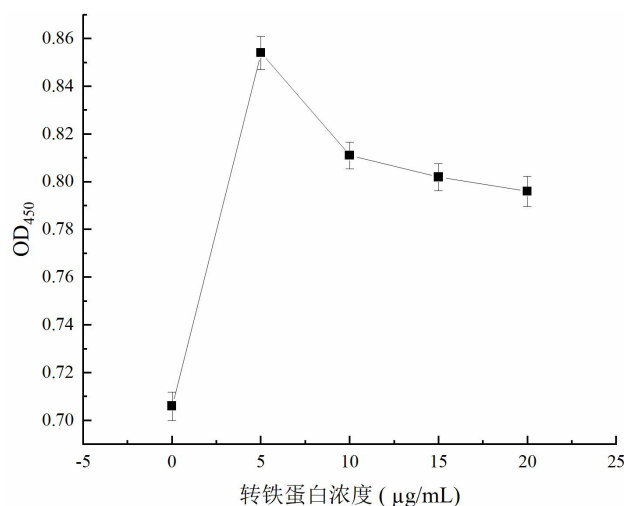


图 2.7 转铁蛋白浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.7 Effect of transferrin concentration on cell growth

转铁蛋白能降低氧自由基和过氧化氢的毒性水平，控制体内游离、循环铁的水平，从而维持细胞生长增殖。由图 2.7 可知，随着转铁蛋白添加浓度的增加，上清效价 OD<sub>450</sub> 值总体呈现先上升后下降的趋势，在 5μg/mL 时达到最高，且与其他组存在较明显差异。

因此选定以  $5\mu\text{g/mL}$  为中心,  $0\sim 10\mu\text{g/mL}$  为后续 PB 试验的浓度范围。

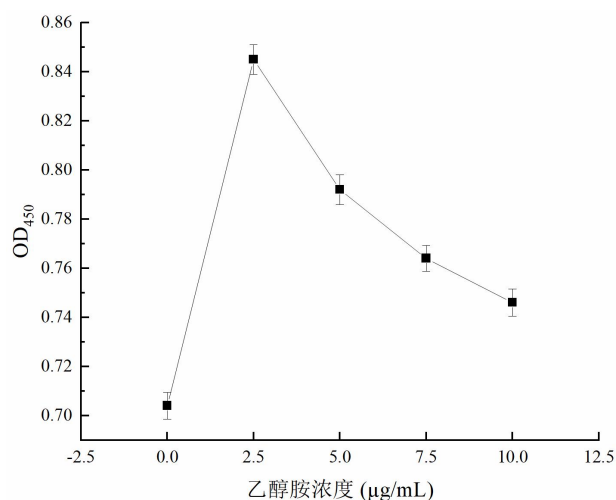


图 2.8 乙醇胺浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.8 Effect of ethanolamine concentration on cell growth

乙醇胺是磷脂酰乙醇胺（动物细胞膜中的主要磷脂）的基本成分，对杂交瘤细胞的增殖起重要作用。由图 2.8 可知，随着乙醇胺添加浓度的增加，上清效价  $\text{OD}_{450}$  值总体呈现先上升后下降的趋势，在  $2.5\mu\text{g/mL}$  时达到最高，且与其他组存在较明显差异。因此选定以  $2.5\mu\text{g/mL}$  为中心,  $0\sim 5\mu\text{g/mL}$  为后续 PB 试验的浓度范围。

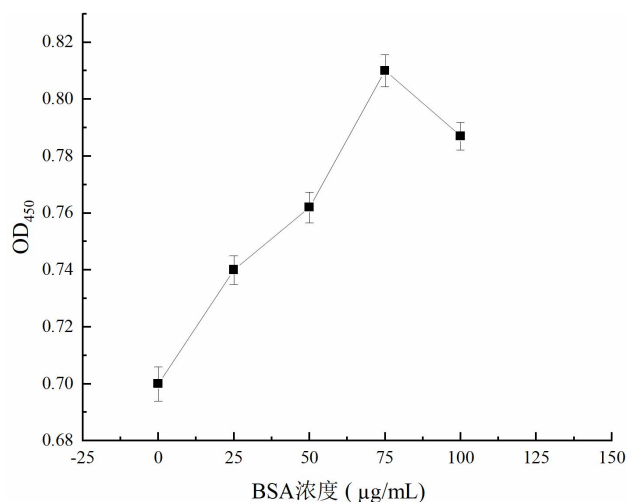


图 2.9 BSA 浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.9 Effect of BSA concentration on cell growth

BSA 具有维持渗透压、pH 缓冲能力、作为载体和提供营养等功能。在动物细胞无/低血清培养中，还可起到生理和机械保护作用，减少细胞损伤。由图 2.9 可知，随着 BSA 添加浓度的增加，效价  $\text{OD}_{450}$  值总体呈现先上升后下降的趋势，在  $75\mu\text{g/mL}$  时达到最高，且与其他组存在较明显差异。因此选定  $50\sim 150\mu\text{g/mL}$  为后续 PB 试验的浓度范围。



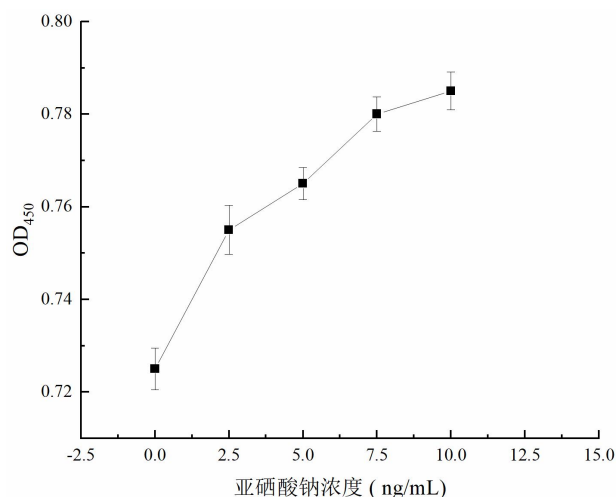


图 2.10 亚硒酸钠浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.10 Effect of sodium selenite concentration on cell growth

亚硒酸钠可作为谷胱甘肽过氧化物酶和其他蛋白质的辅助因子（辅基），具有抗过氧化能力，参与消除细胞内的脂肪酸过氧化物，提高细胞的生长速率和活性。由图 2.10 可知，随着亚硒酸钠添加浓度的增加，上清效价 OD<sub>450</sub> 值总体呈现缓慢上升的趋势，在 10ng/mL 时达到最高，但与 7.5ng/mL 时的结果相差不大，推测继续提高亚硒酸钠添加浓度不会对细胞产生显著影响。因此选定以 10ng/mL 为中心，5~15ng/mL 为后续 PB 试验的浓度范围。

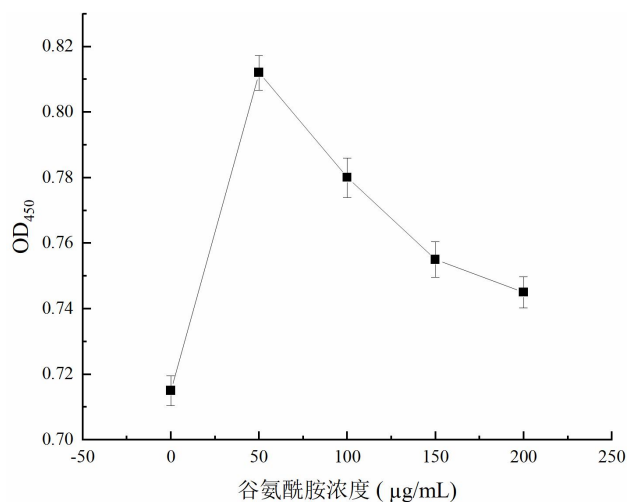


图 2.11 谷氨酰胺浓度对细胞生长的影响

Fig. 2.11 Effect of glutamine concentration on cell growth

L-谷氨酰胺是细胞生长的必须氨基酸，脱氨基后可作为培养细胞的能量来源，参与蛋白质的合成和核酸代谢。由图 2.11 可知，随着谷氨酰胺添加浓度的增加，上清效价 OD<sub>450</sub> 值总体呈现先上升后下降的趋势，在 50μg/mL 时达到最高，且与其他组存在较明显差异。分析认为：基础培养基本身就含有一定浓度的谷氨酰胺，且谷氨酰胺经过一段

时间会降解, 导致氨的形成而氨对细胞有害, 其次谷氨酰胺的利用率与添加浓度成反比关系, 因此不需要添加较高浓度的谷氨酰胺。由此选定以 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  为中心, 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  为后续 PB 试验的浓度范围。

综上, 根据单因素实验结果初步确定每个因子的浓度范围, 即胰岛素 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 0~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚硒酸钠 5~15 $\text{ng}/\text{mL}$ 、BSA50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、谷氨酰胺 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 为后续 PB 试验因素水平的设计做铺垫。

### 2.3.4.2 PB 实验结果

通过Plackett-Burman实验设计筛选 6 种营养因子中对细胞生长有重要影响作用的培养基成分。根据单因素试验结果分析, 初步确定影响细胞上清读数的 6 个因子添加浓度, 每个因素取高低两水平, 各因素及其编码水平如表 2.7 所示, 进行 12 次试验, 每组试验重复 4 次, 以抗AVI杂交瘤细胞生长到第 5 天所测的上清效价OD<sub>450</sub> 值为响应值, 试验结果为 4 个平行试验结果的平均值, 试验设计结果及分析见表 2.8、2.9。

表 2.7 Plackett-Burman 试验参数及水平  
Table 2.7 Factors and levels of Plackett-Burman design

Code	Variables	Level(-1)	Level(+1)
A	牛血清白蛋白 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	50	150
B	亚硒酸钠 ( $\text{ng}/\text{mL}$ )	5	15
C	胰岛素 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	10
D	谷氨酰胺 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	100
E	转铁蛋白 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	10
F	乙醇胺 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	5

表 2.8 Plackett-Burman 试验设计及响应值  
Table 2.8 Plackett-Burman design and responding value

Run	A	B	C	D	E	F	Y
1	50	5	0	0	0	0	0.215
2	150	15	0	0	0	5	0.493
3	150	5	10	0	10	5	1.067
4	50	15	10	100	0	5	0.71
5	150	15	0	0	10	0	0.594
6	50	15	10	0	0	0	0.511
7	150	15	10	100	10	0	1.014
8	150	5	10	100	0	0	0.314
9	50	15	0	100	10	5	0.952
10	50	5	0	100	10	0	0.871
11	50	5	10	0	10	5	1.139
12	150	5	0	100	0	5	0.327

表 2.9 Plackett-Burman 实验的方差分析结果  
Table 2.9 Analysis of variance of Plackett-Burman experiment

Variables	Degree of freedom	F-value	Prob>F
Model	6	18.49	0.0029
A	1	2.97	0.1455
B	1	0.9952	0.3643
C	1	14.53	0.0125
D	1	0.2444	0.6420
E	1	80.51	0.0003
F	1	11.70	0.0188

采用Design-Expert 11 对试验结果进行数据处理, 拟合出一次回归方程为:

$$Y=0.249583-0.000982A+0.005683B+0.021717C+0.000282D+0.051117E+0.038967F \quad (2-2)$$

Y为每组试验的响应值。

该回归模型的  $P$  值为 0.0029, 小于 0.05, 表示模型极其显著; 决定系数 (Determination coefficient  $R^2$ ) 为 0.9569, 说明 96.69% 的变量可以用此模型解释; 调整决定系数 (Adjusted determination coefficient  $Adj R^2$ ) 为 0.9051, 和决定系数差别不大, 表明此模型拟合较好。根据  $P$  值确定各因子对响应值的影响程度, 当  $P < 0.05$  时说明该因子对响应值有显著影响, 反之则不显著。因此由表 2.9 可得, C-胰岛素 ( $P=0.0125$ )、E-转铁蛋白 ( $P=0.0003$ )、F-乙醇胺 ( $P=0.0188$ ) 为显著因素, 并根据  $P$  值大小得到显著程度为 E-转铁蛋白 > C-胰岛素 > F-乙醇胺。综上, 将这 3 个显著因素进一步进行最陡爬坡试验设计。

### 2.3.4.3 最陡爬坡实验结果

根据 Plackett-Burman 实验结果设计最陡爬坡实验, 不断缩小添加因子的最佳浓度范围, 试验设计及结果见表 2.10。

表 2.10 最陡爬坡试验设计及结果  
Table 2.10 Design and results of steepest climbing test

序号	胰岛素 ( $\mu\text{g/mL}$ )	转铁蛋白 ( $\mu\text{g/mL}$ )	乙醇胺 ( $\mu\text{g/mL}$ )	读数
1	0	0	0	0.834
2	2	2	1	0.942
3	4	4	2	0.954
4	6	6	3	1.032
5	8	8	4	1.092
6	10	10	5	1.034

根据 Plackett-Burman 试验结果筛选出胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺对响应值有显著影响, 设定这三个因素的上升路径和步长, 进行最陡爬坡试验以逼近最大响应值范围, 以间接 ELISA 测定的第 5 天细胞上清效价  $OD_{450}$  为响应值, 每组试验重复 4 次, 考察胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺在培养基中的最适浓度范围, 同时设立 12.5% 血清浓度的组作为对照组。由表 2.10 可得, 随着胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺添加浓度的提升, 响应值基本呈现先上升后下降的趋势, 并在胰岛素浓度为  $8\mu\text{g/mL}$ , 转铁蛋白浓度为  $8\mu\text{g/mL}$ , 乙醇胺浓度为  $4\mu\text{g/mL}$  时, 响应值达到最大, 且与对照组 (12.5% 血清浓度组) 的值 1.078 接近, 说明此时的浓度最接近培养基中胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺的最佳浓度。因此将该浓度作为 Box-Behnken 响应面试验的中心点, 进行响应面试验。

### 2.3.4.4 响应面实验结果

根据最陡爬坡试验结果,确定胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺的浓度范围分别为 8 $\mu\text{g/mL}$ 、8 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ ,并以此为 Box-Behnken 响应面试验的中心点进行实验设计。以间接 ELISA 测定的细胞生长 5 天的上清效价 OD<sub>450</sub> 值作为响应值,共进行 17 次试验,其中包括 5 个中心点,用于估计实验误差。试验编码及水平见表 2.11,试验设计及结果见表 2.12,数据分析见表 2.13。

表 2.11 Box-Behnken 试验因素及水平  
Table 2.11 Factors and levels of Box-Behnken response surface

因素	编号	水平		
		-1	0	1
胰岛素 ( $\mu\text{g/mL}$ )	A	6	8	10
转铁蛋白 ( $\mu\text{g/mL}$ )	B	6	8	10
乙醇胺 ( $\mu\text{g/mL}$ )	C	3	4	5

表 2.12 Box-Behnken 试验设计及结果  
Table 2.12 Experimental designs and results of Box-Behnken response surface

序号	A ( $\mu\text{g/mL}$ )	B ( $\mu\text{g/mL}$ )	C ( $\mu\text{g/mL}$ )	Y
1	0	-1	-1	1.193
2	0	-1	1	1.257
3	0	1	1	1.162
4	0	0	0	1.298
5	0	0	0	1.315
6	1	0	-1	1.185
7	0	0	0	1.322
8	1	1	0	1.179
9	1	-1	0	1.224
10	-1	0	1	1.211
11	0	1	-1	1.145
12	0	0	0	1.326
13	-1	1	0	1.128
14	-1	-1	0	1.217
15	-1	0	-1	1.209
16	0	0	0	1.312
17	1	0	1	1.250

表 2.13 Box-Behnken 试验结果方差分析表

Table 2.13 Analysis of variance for the experimental results of Box-Behnken response surface

来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
Model	0.0659	9	0.0073	69.90	<0.0001
A	0.0007	1	0.0007	6.36	0.0397
B	0.0096	1	0.0096	91.60	<0.0001
C	0.0027	1	0.0027	26.15	0.0014
AB	0.0005	1	0.0005	4.62	0.0686
AC	0.0010	1	0.0010	9.48	0.0179
BC	0.0006	1	0.0006	5.27	0.0553
A <sup>2</sup>	0.0112	1	0.0112	106.86	<0.0001
B <sup>2</sup>	0.0244	1	0.0244	232.57	<0.0001
C <sup>2</sup>	0.0102	1	0.0102	97.74	<0.0001
残差	0.0007	7	0.0001		
失拟项	0.0003	3	0.0001	0.7584	0.5729
纯误差	0.0005	4	0.0001		
校正总和	0.0666	16			

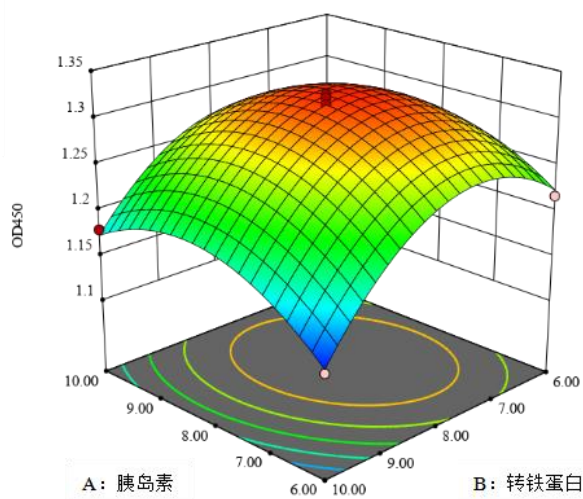
利用 Design-Expert 11 软件对表中的数据进行回归分析，拟合得到回归方程：

$$Y=1.31+0.0091A-0.0346B+0.0185C+0.0110AB+0.0158AC-0.0117BC-0.0516A^2-0.0761B^2-0.0493C^2 \quad (2-3)$$

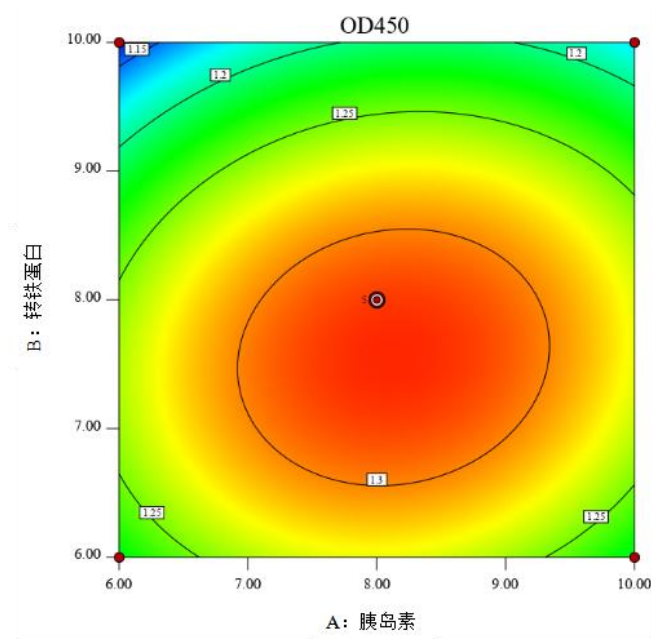
由于回归方程中平方项的系数均为负数，说明该方程具有最大值。解得当胰岛素 8.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 7.522 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 4.232 $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，响应值达到最大，为 1.321。该回归模型的 *P* 值小于 0.05，表示模型极其显著；模型  $R^2=0.9890$ ，说明 98.90% 的变量可以用此模型解释；Adj  $R^2=0.9748$ ，和决定系数差别不大，表明此模型拟合较好。

利用 Design-Expert 11 软件绘制胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺三个影响因素两两交互作用对细胞上清效价 OD<sub>450</sub> 值影响的三维响应面分析图及二维等高线图，如图 2.12、2.13、2.14 所示。响应图的曲面倾斜程度和颜色变化趋势可以反映试验因素对响应值的影响程度，倾斜度越高，颜色变化剧烈且呈加深趋势，则说明该因素对试验的响应值影响越显著，反之则不显著。通过等高线图的形状即可直观判断两两因素之间的交互作用对响应值影响的显著程度，等高线形状为椭圆形，则表示两因素之间交互作用显著，且最小椭

圆的中心点即为响应面的最高点，若为圆形则表示两因素之间交互作用不显著。



(a) 胰岛素与转铁蛋白间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图  
 (a) Response surface plot of the effect of the interaction between insulin and transferrin on the OD value of titer



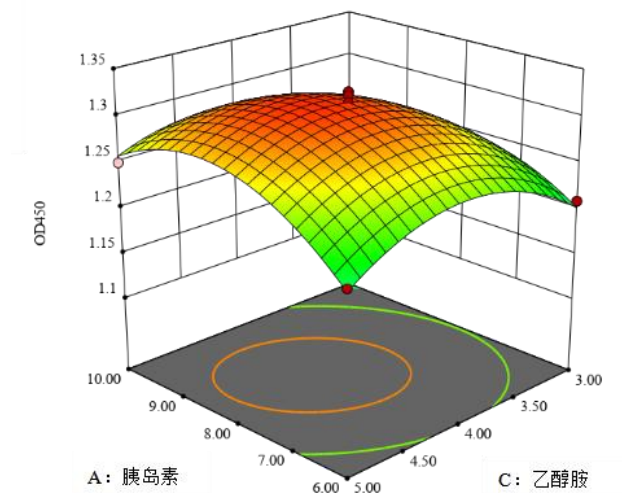
(b) 胰岛素与转铁蛋白间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图  
 (b) Contour map of the effect of the interaction between insulin and transferrin on the OD value of titer

图 2.12 胰岛素与转铁蛋白间的交互作用对效价 OD<sub>450</sub> 值的影响

Fig. 2.12 The effect of the interaction between insulin and transferrin on titer OD<sub>450</sub>

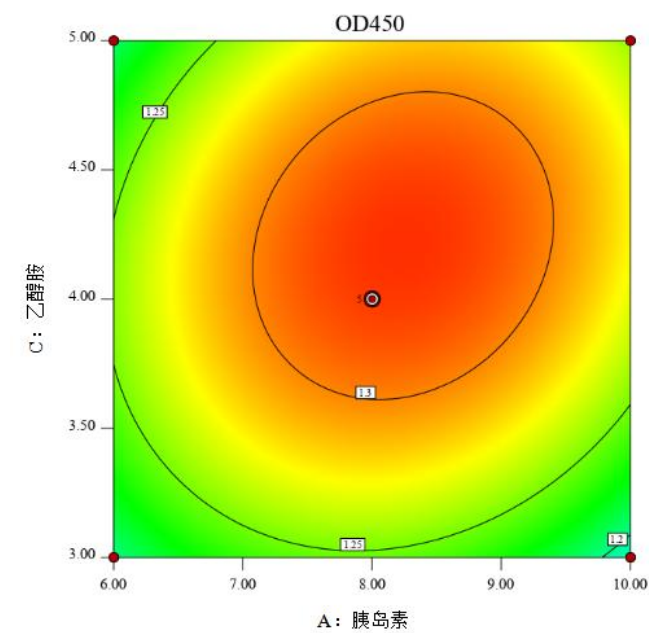
由图 2.12 (a) 可知，当乙醇胺浓度不变时，A (胰岛素) 或 B (转铁蛋白) 浓度处于高或低水平时，响应值 OD<sub>450</sub> 随着另一浓度的增加，总体呈现先上升后下降的趋势，

但其一因子变化幅度不受另一因子浓度变化的影响；响应面图呈马鞍型，说明在范围内响应值存在最大值。由图 2.12 (b) 可得等高线呈圆形，综上所述表明 A (胰岛素) 与 B (转铁蛋白) 两因素间交互作用不显著。



(a) 胰岛素与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图

(a) Response surface plot of the effect of the interaction between insulin and ethanolamine on the OD value of titer



(b) 胰岛素与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图

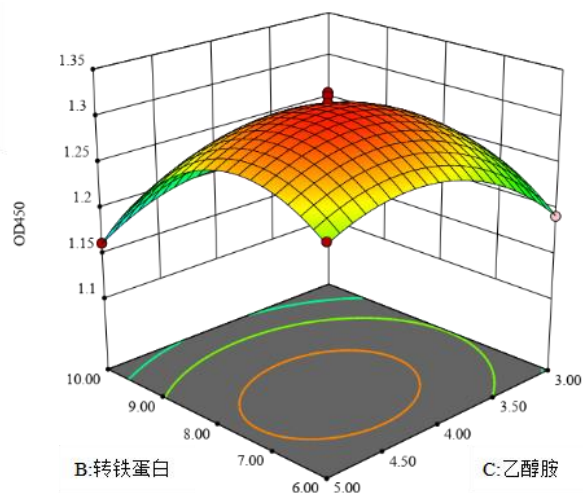
(b) Contour map of the effect of the interaction between insulin and ethanolamine on the OD value of titer

图 2.13 胰岛素与乙醇胺间的交互作用对效价 OD<sub>450</sub> 值的影响

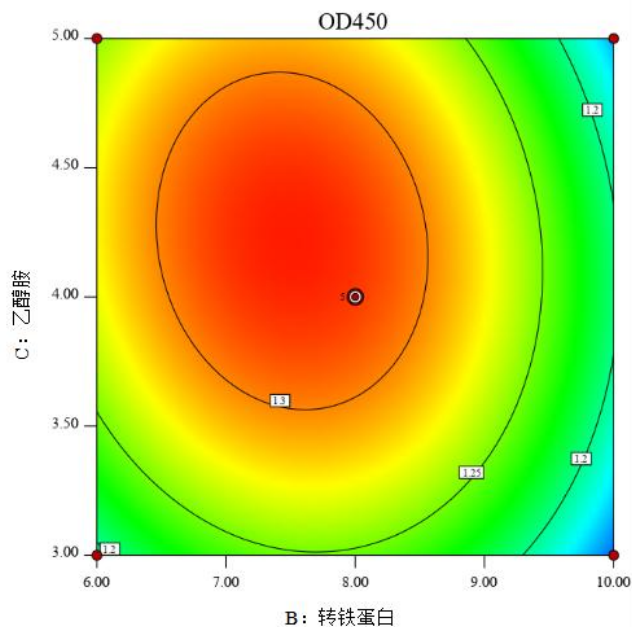
Fig. 2.13 The effect of the interaction between insulin and ethanolamine on titer OD<sub>450</sub>



由图 2.13 (a) 可知, 当转铁蛋白浓度保持不变时, 胰岛素和乙醇胺浓度变化对  $OD_{450}$  值的变化影响均表现为趋势线先上升后下降; 响应面图呈马鞍型说明响应值在范围内存在最大值。由图 2.13 (b) 可得等高线为椭圆形, 表明 A (胰岛素) 与 C (乙醇胺) 两因素间交互作用显著。



(a) 转铁蛋白与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的响应面图  
 (a) Response surface plot of the effect of the interaction between transferrin and ethanolamine on the OD value of titer



(b) 转铁蛋白与乙醇胺间交互作用对效价 OD 值影响的等高线图  
 (b) Contour map of the effect of the interaction between transferrin and ethanolamine on the OD value of titer

图 2.14 转铁蛋白与乙醇胺间的交互作用对效价  $OD_{450}$  值的影响

Fig. 2.14 The effect of the interaction between transferrin and ethanolamine on titer  $OD_{450}$

由图 2.14 (a) 可知, 当胰岛素浓度不变时, B (转铁蛋白) 或 C (乙醇胺) 浓度处于范围内任一浓度时, 另一因素的浓度变化对响应值  $OD_{450}$  均有显著影响, 总体均呈现先上升后下降的趋势, 但该趋势受另一因素浓度变化的影响较小; 响应面图呈马鞍型说明响应值在范围内存在最大值。根据图 2.14 (b) 可得 B (转铁蛋白) 与 C (乙醇胺) 两因素间交互作用不显著。

综合上述结果, 得到培养基配方为: 7.5%胎牛血清, 基础培养基为 DMEM/F12, 添加胰岛素  $8.197\mu\text{g/mL}$ 、转铁蛋白  $7.522\mu\text{g/mL}$ 、乙醇胺  $4.232\mu\text{g/mL}$ , 1%双抗和 0.5%谷氨酰胺。

#### 2.3.4.5 回归模型验证

在响应面优化后的最优条件下进行 5 次验证试验, 以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 为响应值。在此条件下测得细胞上清效价  $OD_{450}$  值的平均值为  $1.293 \pm 0.037$ , 与预测值 1.321 无显著差异, 说明该模型能较好的反映各因素对细胞分泌抗体的影响, 说明通过响应面实验进行优化培养基成分是可行有效的。

#### 2.3.5 摇瓶放大试验

采用响应面优化后的最佳添加组合在摇瓶中进行放大试验, 检验最佳添加策略在摇瓶中的有效性, 为之后进行体外扩大培养提供试验基础。同时以 12.5%血清培养基和 7.5%血清培养基作为对照, 对比细胞生长情况和上清效价 OD 值, 结果见表 2.14 和图 2.15。

表 2.14 摇瓶条件下细胞上清效价 OD  
Table 2.14 Cell supernatant titer OD under shake flask conditions

组别	12.5%	7.5%	7.5%+优化
$OD_{450}$	$1.246 \pm 0.044$	$0.944 \pm 0.034$	$1.397 \pm 0.047$

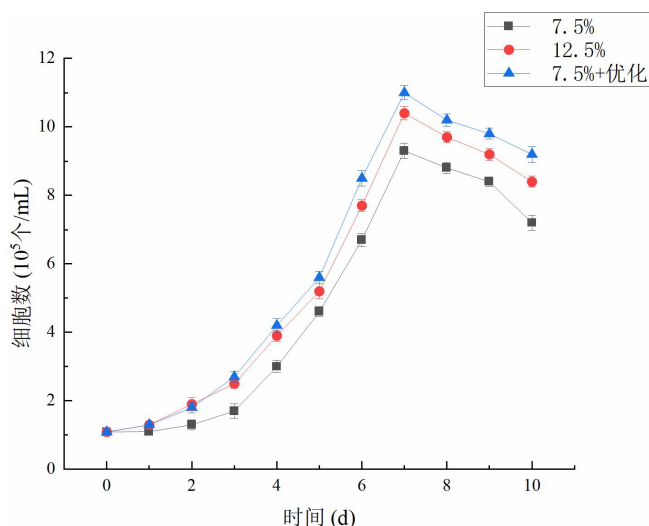


图 2.15 摇瓶条件下细胞增长情况

Fig. 2.15 Cell growth under shake flask conditions

由图 2.15 可得，三组实验条件下的细胞生长趋势基本一致，先是适应期缓慢生长，由于细胞在孔板中是贴壁培养，而转到摇瓶中则变为悬浮培养，但细胞转接摇瓶前未经过悬浮驯化，因此在该实验中适应期较长。之后细胞快速增长，在第 7 天细胞数达到峰值，然后细胞开始衰亡，细胞数明显下降。其中含 7.5%血清浓度的优化条件组细胞数的峰值最大，12.5%组次之，7.5%组最小。从表 2.14 结果可知，含 7.5%血清浓度的优化条件组的上清效价 OD 值最大，好于 12.5%组和 7.5%组，且结果略优于孔板条件，可能是摇瓶培养条件下细胞密度高于孔板，因此产抗体的细胞更多，抗体分泌情况更佳。综上所述表明，在摇瓶放大条件下仍然适用优化后的培养基条件，且优化后细胞数和抗体分泌情况好于未优化前使用的含 12.5%血清的培养基条件。

## 2.4 本章小结

### 2.4.1 讨论

实验室常用的细胞培养基包括：DMEM、RPMI-1640、M199、MEM、F-10、F-12、IMDM、DMEM/F12、欧式平衡盐、水解乳蛋白、ProCHO5 等<sup>[74]</sup>。其中 DMEM/F12 由 F12 与 DMEM 1:1 混合而成，结合了 F12 含有较丰富的成分和 DMEM 含有较高浓度的营养成分的优点，适用于低血清含量条件下哺乳动物细胞培养。本研究考察了 RPMI1640、DMEM/F12、1640:DMEM/F12=1:1 等基础培养基对细胞生长的影响，根据细胞生长情况和抗体分泌能力确定 DMEM/F12 为基础培养基。

20 世纪 50 年代初, Eagle 发明了含有氨基酸、维生素、碳水化合物、矿物质和体液的基础培养基<sup>[38]</sup>。之后该培养基用 20%动物血清替代体液后得到了广泛使用, 由此血清开始作为细胞培养基添加物使用。添加血清与未添加血清的培养基相比, 细胞存活率更高, 生长密度更大以及持续培养时间更长<sup>[39]</sup>。血清根据来源不同可分为牛血清、人血清和马血清。其中牛血清被广泛用于细胞培养, 其制品包括胎牛血清、新生牛血清和小牛血清。本研究采用胎牛血清进行添加, 因胎牛未接触外部环境, 含有的细胞毒害成分最少同时成本最高。血清中富含细胞生长所必需的营养物质, 包括生长因子、激素、蛋白质、维生素、微量元素、脂肪、无机盐等物质; 在体外可以再造适于细胞生长、繁殖、黏附和分化的生理环境, 是组织细胞培养中最常用的天然培养基<sup>[75]</sup>。但血清的使用也存在一定风险, 如成分复杂, 难以明确每个组分的作用, 存在批次间差异, 不能保证实验结果的重现, 限制了批次生产的标准化和连续化。因此本研究期望降低培养基中的血清浓度, 建立低血清培养体系; 通过考察不同血清浓度对细胞生长的影响, 证实血清浓度的降低会明显影响细胞的生长和抗体分泌能力, 因此在建立低血清培养体系之前采用逐步降血清的方式对细胞进行驯化, 使其适应低浓度血清培养。

在 20 世纪 20 年代 R.A.Fisher 创立了试验设计(Design of Experiments) 的基本思想和方法<sup>[76]</sup>。Plackett-Burman 设计由 Plackett 和 Burman 于 1946 年开发为一种确定多因子系统的主要因子效应的捷径方法。它通过对每个因子取两水平来进行分析, 比较各因子两水平的差异与整体的差异来确定因子的显著性, 能用最少试验次数而使因素的主效应得到尽量精确的估计。PB 实验前最好先做单因素预实验, 根据实验结果确定各因素的高低水平。本研究先通过单因素试验确定各营养因子的合适浓度范围, 基于此设计 PB 实验, 确定其中影响显著的因子为胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺。

最陡爬坡试验, 又叫最速上升试验, 能够快速地将各因素水平趋近最优响应值, 最终建立有效的响应面拟合方程<sup>[77]</sup>。本研究对胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺设计上升路径和步长, 将响应值最大时的添加条件设为响应面实验的中心点。

响应面方法(Response Surface Methodology, RSM)由 Box 和 Wilson (1951) 开发, 是数学和统计技术的集合, 基于多项式方程与实验数据的拟合, 描述数据集的行为并用于统计预测<sup>[78]</sup>。RSM 方法的优化可以分为六个阶段<sup>[79]</sup>: (1) 自变量和响应值的选择; (2) 实验设计方法的选择; (3) 实验执行和获得结果; (4) 将模型方程与实验数据拟合; (5) 获得响应图和模型验证(ANOVA); (6) 确定最佳条件。本研究采用 Box-Behnken 设

计, 考察胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺及其相互作用对分泌抗体的影响, 获得最佳添加浓度配比为胰岛素 8.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 7.522 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 4.232 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 并对该最优条件进行模型验证。

## 2.4.2 结论

本研究从完全培养基的组成成分出发, 对各成分进行研究优化。研究内容及结果主要可分为以下 9 个方面:

(1) 基础培养基的确定: 对 RPMI1640、DMEM/F12、1640: DMEM/F12=1: 1 等基础培养基进行考察比较, 以细胞生长情况和分泌抗体情况为指标, 其中 DMEM/F12 培养基效果最好, 因此被选为基础培养基进行后续实验。

(2) 考察血清浓度对细胞生长的影响: 分别以 12.5%、10%、7.5%、5%、2.5% 的血清浓度对细胞生长影响进行考察, 证实随着血清浓度的降低, 细胞的生长速率和抗体分泌能力也随之明显降低, 因此想要降低培养基中的血清浓度需要对细胞进行减血清驯化。

(3) 血清驯化: 细胞在驯化过程中逐步降低血清浓度, 经多次传代后细胞生长情况稳定, 最终细胞驯化后能适应 7.5% 血清浓度, 并再次进行不同血清浓度考察实验。根据结果可知, 细胞经驯化后, 在 7.5% 血清浓度条件下细胞生长和抗体分泌能力相较驯化前有显著提升, 为继续提升分泌抗体能力在此血清浓度基础上进行营养物质的筛选优化。

(4) 单因素实验: 根据相关文献初步选择 6 个营养因子进行单因素实验初步确定各物质合适的浓度范围, 以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 为响应值, 根据响应值峰值所在浓度范围确定各营养因子合适的添加浓度, 得到胰岛素 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 0~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚硒酸钠 5~15 $\text{ng}/\text{mL}$ 、BSA 50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、谷氨酰胺 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(5) Plackett-Burman 实验: 按单因素实验结果对每个因子取两水平设计 PB 实验, 以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 为响应值, 采用 Design-Expert 11 软件对试验结果进行方差分析, 根据各因子对应的  $P$  值大小确定显著影响因子为胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺。

(6) 最陡爬坡实验: 对胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺设计上升路径和步长进行最陡

爬坡实验,以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 为响应值,选择响应值达到最大时的浓度添加条件。结果表明,随着营养因子添加浓度的提升,响应值先上升后下降,在胰岛素浓度为  $8\mu\text{g}/\text{mL}$ ,转铁蛋白浓度为  $8\mu\text{g}/\text{mL}$ ,乙醇胺浓度为  $4\mu\text{g}/\text{mL}$  时,响应值最大,并以此为 Box-Behnken 响应面试验的中心点,进行响应面试验。

(7) Box-Behnke 响应面实验:将胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺三因素取三水平,进行 17 组试验,以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 为响应值,采用 Design-Expert 11 软件对试验结果进行方差分析,得到拟合方程并绘制响应面曲线图,求得最佳浓度分别为胰岛素  $8.197\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白  $7.522\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺  $4.232\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此时响应值达到最大为 1.321。

(8) 模型验证:将最优添加条件进行 5 次验证,得到实际值  $1.293 \pm 0.037$  与理论值 1.321 无显著差异,说明该模型的有效性。

(9) 摇瓶放大实验:通过摇瓶放大实验对最优添加组合进一步验证,结果表明最优组合培养基条件的细胞生长和上清效价 OD 情况均优于含 12.5% 血清浓度培养基条件,证明最优组合培养基效果良好。

### 第3章 阿维拉霉素胶体金免疫层析试纸法的研究

胶体金免疫层析技术是以胶体金为示踪物,将特异性免疫反应和层析技术相结合的固相快速检测技术。因其具有检测快速、价格低廉、结果可视化、便携、操作简单等优点,而广泛应用于食品安全和疾病防控等领域。目前,胶体金免疫层析技术已应用于检测细菌毒素、过敏原、非法添加物、致病菌、重金属及农兽药残留等,适用于基层大规模筛查和现场快速检测。胶体金免疫层析技术根据待测物质分子量大小可分为竞争结合法和双抗夹心法,竞争法适合小分子物质检测,双抗法适合大分子检测。

本研究采用竞争结合法研发检测阿维拉霉素的胶体金免疫层析试纸条。利用杂交瘤细胞通过腹水诱生法制备腹水并对其进行纯化获得单克隆抗体,纯化后抗体经鉴定后用于胶体金标记。通过优化胶体金标记抗体时的条件,以及确定 T 线和 C 线的划膜浓度组合,建立胶体金免疫层析试纸条并对其进行性能评价。

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 实验试剂

表 3.1 试剂  
Table 3.1 Reagents of experiments

名称	生产商	规格
正辛酸	国药集团化学试剂	AR
BCA 试剂盒	凯基生物	生化试剂
越霉素	南京都莱生物技术公司	USP 级
晚霉素 B	南京都莱生物技术公司	USP 级
潮霉素	南京都莱生物技术公司	USP 级
GavibamycinA3	南京都莱生物技术公司	USP 级
Ziracin	南京都莱生物技术公司	USP 级
SDS-PAGE 试剂盒	上海生工	生化试剂
考马斯亮蓝试剂盒	南京建成生物工程研究所	生化试剂
单抗腹水制备用佐剂	北京博奥龙	生化试剂
Protein G Agarose Resin 4FF 柱	翌圣生物科技	生化试剂

### 3.1.2 实验材料与仪器

表 3.2 仪器设备  
Table 3.2 Instruments of experiments

名称	型号	厂家
紫外分光光度计	UV-3200PC	上海美谱达仪器
酶标仪	SPECTRA max M2	美国分子仪器公司, USA
冷冻离心机	H-2050R	湘仪离心机仪器有限公司
冷冻干燥机	LGJ-25C	北京四环科学仪器有限公司
点膜仪	R5DDA	杭州韩感科技有限公司
100 $\mu$ L 移液器	ACURA 825	瑞士 Socorex
酸度计	FE20k	梅特勒托利多

### 3.1.3 溶液配制

(1) 60mM 的醋酸缓冲液: A: 0.06mol/L NaAc: 称 0.492g NaAc 超纯水定容至 100 mL; B: 0.06mol/L HAc: 取 0.344mL HAc 超纯水定容至 100 mL; A 与 B 以 50:40 进行混合, 调 pH=4。

(2) 结合/洗杂缓冲液: 称取 0.877g NaCl, 0.716g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 超纯水定容至 100mL, 调 pH=7.0。

(3) 中和液: 称取 12.114 g Tris, 超纯水定容至 100mL, 浓 HCl 调 pH=8.5。

(4) 洗脱缓冲液: 称取 0.7507g 甘氨酸, 超纯水定容至 100mL, 调 pH=3.0。 (5) 0.2M 碳酸钾溶液: 称取 2.764g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 超纯水定容至 100 mL。

(6) 10%氯化钠: 称取 10g NaCl, 超纯水定容至 100 mL。

(7) 10%BSA: 称取 1g BSA, 超纯水定容至 10mL。



## 3.2 实验方案

### 3.2.1 单克隆抗体的制备

#### 3.2.1.1 腹水诱生

采用小鼠体内腹水诱生法制备腹水，步骤如下：

(1) 选取 5 只 8-10 周龄雌性 BALB/c 小鼠，腹腔注射 0.5 mL 单抗腹水制备用佐剂。

(2) 佐剂注射一周后，再腹腔注射 0.5 mL 浓度为  $10^6$  个/mL 处于对数生长期，并且生长状态良好的杂交瘤细胞。

(3) 约一周后，小鼠腹部开始胀大，行动缓慢，背部毛松动，用注射器穿刺腹腔，收集腹水。

(4) 将收集的腹水于 4°C，10000 r/min 离心 20 min，去除细胞碎片和脂质物，收集上清液，即为腹水单抗，置于 -20°C 备用。

#### 3.2.1.2 腹水纯化

##### (1) 辛酸-硫酸铵沉淀

将腹水在 4°C 下 10000 转离心 10 分钟取上清，加入 4 倍体积的 60mM 的醋酸缓冲液进行稀释边加边搅拌。然后用 1M 的 NaOH 溶液调节溶液 pH=4.5。接着缓慢滴加辛酸（每毫升加 33 $\mu$ L），边加边搅拌，加完后室温搅拌 30min，4°C 静置 2h 以上，使其充分沉淀。4°C 下 8000 转离心 30min 收集上清，（须在冰上操作）然后向上清中加入 1/10 体积的 0.1M PBS(pH7.4)，混匀后用 1M 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.4，缓慢加入 0.277g/mL 的固体硫酸铵，加边搅拌，加完后继续搅拌 20min，4°C 静置过夜。第二天 4°C 下 12000 转离心 30min，弃上清，加入适量结合缓冲液进行溶解。

##### (2) 亲和层析

平衡：上样前用 5 倍柱体积的结合缓冲液平衡层析柱，使填料处于与目的蛋白相同缓冲体系下，起到保护蛋白的作用。

上样：将样品加到平衡好的层析柱中，收集流出液，待检测。

洗杂：加入 10-15 倍柱体积的结合缓冲液后，非特异性吸附的杂蛋白会被冲洗，收集流出液，待检测。

洗脱：加入 5-10 倍的洗脱缓冲液，收集流出液，即目的蛋白。

（清洗及保存：填料依次使用 3 倍柱体积的结合缓冲液、5 倍柱体积的去离子水和 5 倍柱体积的 20%乙醇平衡，最后在等体积的 20%的乙醇中，置于 4℃ 保存。）

将粗纯后和亲和层析后的样品进行 SDS-PAGE 检测，鉴定其纯度。

### 3.2.2 单克隆抗体的鉴定-间接 ELISA 法

（1）包被：用包被缓冲液将包被原稀释到一定浓度，在酶标板中每孔加入 100  $\mu$ L 置于 37℃ 孵育 2h（或 4℃ 过夜）。

（2）洗板：甩掉板中的溶液，每孔加入 200 $\mu$ L PBST（洗涤液），水平摇晃板约 30 秒左右，甩掉洗涤液。共洗板 3 次，洗完在滤纸上拍干至没有水印出现。

（3）封闭：向每孔加入 200 $\mu$ L 封闭液，置于 37℃ 封闭 1h。封闭结束后洗板 3 次，用滤纸拍干。

（4）加一抗：用 PBS 稀释抗体为一系列梯度浓度的样品，每孔中加入 100 $\mu$ L 抗体样品，在 37℃ 孵育 1h。孵育结束后洗板 3 次，滤纸拍干。

（5）加二抗：每孔加入 100 $\mu$ L 酶标二抗（稀释度 1: 5000），在 37℃ 孵育 1h。孵育结束后洗板 3 次，滤纸拍干。

（6）显色：每孔加入 100 $\mu$ L TMB 显色液，在 37℃ 下孵育 20min。

（7）终止：每孔加入 50 $\mu$ L 2mol/L 的硫酸终止反应。

（8）读数：在酶标仪 450nm 处读取 OD 值。

### 3.2.3 胶体金-抗体偶联物的制备

（1）吸取一定体积颗粒均匀的胶体金溶液置于摇床（避光）上慢速搅拌；加入适当的 0.2M  $K_2CO_3$  溶液调节 pH，继续搅拌 10min；

（2）逐滴加入抗体溶液，在进行充分混匀后标记 40min（摇床，避光）；

（3）取 10%BSA 逐滴加入混合溶液中，至 BSA 终浓度为 0.5%，反应 40min；

（4）将溶液转至离心管中，4℃ 下 10000rpm 离心 60min，弃上清，用 PBS 复溶，重复离心操作，弃上清，用胶体金复溶液溶解沉淀，4℃ 下低温保存备用。

## 3.2.4 阿维拉霉素胶体金免疫层析条件的优化

### 3.2.4.1 抗体标记 pH 的优化

取 1mL 胶体金溶液加入数个 1.5mL 离心管中, 分别加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu$ L 的 0.2M  $K_2CO_3$  溶液调节 pH, 上下缓慢摇匀 2min, 然后分别加入过量抗体, 上下缓慢摇匀 20min, 每管加入 100 $\mu$ L 的 10% NaCl 溶液, 上下缓慢摇匀 2min, 静置 60min 后观察颜色变化, 采用比色法进行读数, 其中  $OD_{530}$  值最大时的条件即为最适标记 pH 值。

### 3.2.4.2 抗体标记量的优化

取 1mL 胶体金溶液加入数个 1.5mL 离心管中, 加入最佳 pH 条件下所对应的 0.2M  $K_2CO_3$  添加量, 上下缓慢摇匀 2min, 然后分别加入 10、15、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30 $\mu$ L 的抗体, 上下缓慢摇匀 20min, 每管加入 100 $\mu$ L 的 10% NaCl 溶液, 上下缓慢摇匀 2min, 静置 60min 后观察颜色变化, 采用比色法进行读数, 其中  $OD_{530}$  值最大时的添加条件即为最适标记量。

### 3.2.4.3 T 线和 C 线的划膜浓度优化

根据上述实验确定的最佳抗体标记条件制备金标抗体, 喷涂于结合垫上用于后续实验条件优化。设计 T 线和 C 线一系列划膜浓度, 用阴性样品即 PBS 进行划膜测试。根据 T 线和 C 线的显色情况及划膜用量来选定最佳划膜浓度组合。

## 3.2.5 胶体金免疫试纸条的组装

将金标抗体喷涂于结合垫上, 37 $^{\circ}C$  干燥。用点膜仪将抗原和二抗分别固定于 NC 膜上的检测线和质控线, 37 $^{\circ}C$  干燥。在 PVC 底板上依次粘贴样品垫、结合垫、NC 膜和吸水垫, 各个部分重叠约 2 mm。用切条仪将组装完毕的试纸条切割成宽度为 3 mm 的试纸条, 低温避光干燥密封保存。

### 3.2.6 胶体金免疫试纸条的检测过程

将 50 $\mu$ L 待测样加入加样孔中，待测液与金标抗体通过毛细作用往前移动，经过 T 线和 C 线，最后移动至吸水垫。反应 10min 后观察 T 线和 C 线显色情况。本研究建立的胶体金免疫试纸条采用竞争结合法，T 线上固定抗原并与待测样中的抗原竞争结合金标抗体。若待测样中无抗原，则部分金标抗体被 T 线捕获固定而显色，未被结合的金标抗体继续前进被 C 线捕获并显色，此为阴性结果。若待测样中存在抗原则先与金标抗体结合形成复合物，T 线上固定的抗原因未结合或结合少量金标抗体而不显色或显色浅，抗原与金标抗体复合物因被 C 线捕获而使 C 线显色，则为阳性结果。若 C 线不显色则判定该试纸条已失效。

### 3.2.7 试纸条的性能评价

#### 3.2.7.1 重复性

分别用阴性样本和阳性样本对制备好的胶体金免疫层析试纸条进行检测，各做 3 组重复，观察相同条件下试纸条的显色情况是否一致，以验证试纸条的重复性效果。

#### 3.2.7.2 灵敏度

将阿维拉霉素 A 标准品用 PBS 分别稀释为系列浓度标准溶液，加 50 $\mu$ L 上述标准溶液于试纸条的样品垫上，反应一段时间后观察试纸条的显色情况。随着标准溶液的浓度增大检测线的颜色会越来越浅，直到肉眼观察不到检测线的颜色，此时标准溶液的浓度为试纸条的检测限。

#### 3.2.7.3 交叉反应

选取阿维拉霉素 A 的结构类似物及其衍生化试剂（阿维拉霉素 B、阿维拉霉素混合物、越霉素、扁枝衣霉素、潮霉素、Ziracin、衍生物 Gavibamycin）配制成溶液，对试纸条进行特异性测试，以 PBS 为阴性对照，阿维拉霉素 A 标准溶液为阳性对照，观察试纸条条带显色情况。

### 3.3 实验结果

#### 3.3.1 单克隆抗体的鉴定

##### 3.3.1.1 单克隆抗体的纯度鉴定

通过 SDS-PAGE 对分步纯化后收集到的单克隆抗体进行纯度鉴定，结果如图 3.1 所示。经过辛酸-硫酸铵法初纯后，样品条带清晰且相互分离，但仍存在多个杂条带；亲和层析后样品只有 2 条条带，分子量分别为 55 kDa 和 25 kDa 左右，为抗体的重链和轻链。根据条带结果说明抗体纯化效果较好，利于制备胶体金-抗体偶联物。

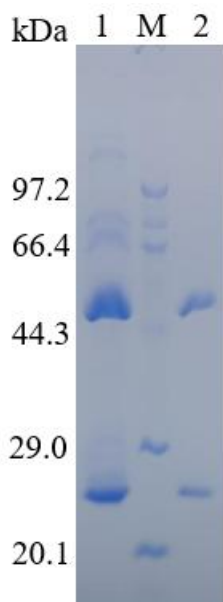


图 3.1 纯化后单克隆抗体的 SDS-PAGE 图

(M) 蛋白 Marker (1) 辛酸-硫酸铵法纯化后单抗 (2) 亲和层析纯化后单抗

Fig. 3.1 SDS-PAGE of monoclonal antibody after purification

(M) protein marker (1) purified monoclonal antibody from caprylic acid-ammonium sulfate precipitation method (2) purified monoclonal antibody from Affinity chromatography method

##### 3.3.1.2 腹水蛋白回收率结果

对腹水纯化过程进行跟踪测定，用间接 ELISA 法测定抗体的效价，用 BCA 试剂盒和考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度，结果如表 3.3 所示。由于腹水中含有大量非目标单抗，如血清白蛋白、脂类蛋白、白蛋白、转铁蛋白、 $\alpha$ -巨球蛋白以及其他宿主蛋白等，因此在初步纯化阶段经辛酸-硫酸铵法粗纯后的单抗蛋白回收率仅有 6.76%；而经亲和层

析过柱后的单抗蛋白回收率为 35.9%，但仍不是很高，可能是洗脱液 pH 过低导致部分蛋白质降解，影响蛋白回收率。

表 3.3 单克隆抗纯化结果  
Table 3.3 Monoclonal Antibody Purification Results

样品	蛋白浓度 (mg/mL)	总蛋白 (mg)	总效价(U)	比效价(U/mg)	回收率(%)
腹水	31.8	63.6	128000	2012.58	100
辛酸-硫酸铵法	4.3	4.3	16000	3720.93	6.76
亲和层析	0.386	1.544	8000	5181.35	35.9

### 3.3.2 胶体金免疫层析条件的优化

#### 3.3.2.1 最佳标记 pH 的确定

在离心管中分别加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 $\mu$ L 的 0.2M  $K_2CO_3$  溶液调节 pH，反应完毕后胶体金溶液颜色变化情况见下图 3.2；每管取 200 $\mu$ L 用酶标仪读取 OD<sub>530</sub> 值，比较每管的读数大小，结果如下图 3.3。

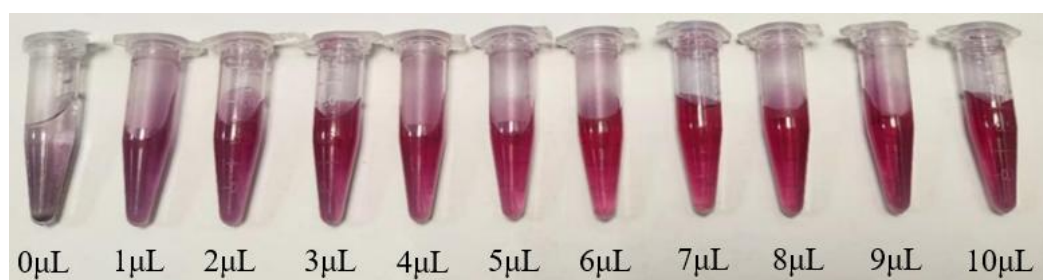
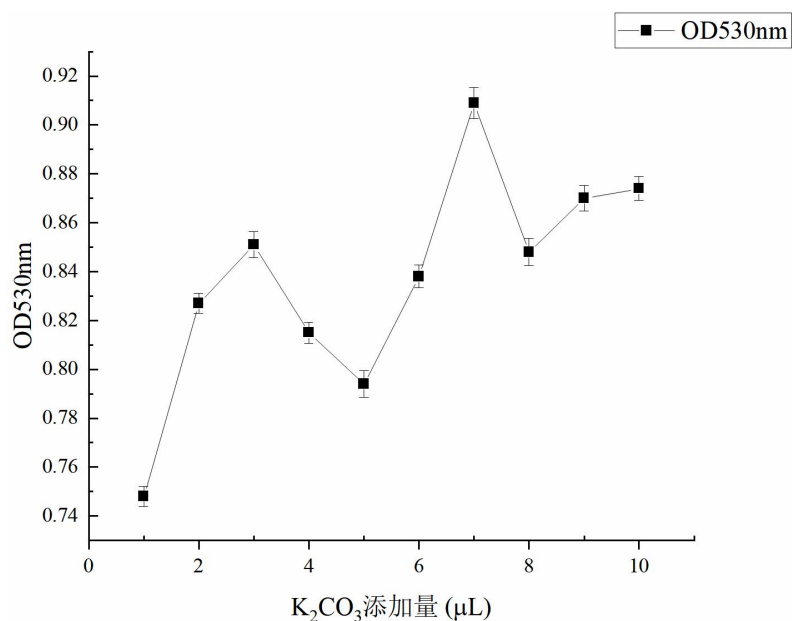


图 3.2 最适标记 pH 的确定  
Fig. 3.2 Determination of optimum labelling pH

图 3.3 不同 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 添加量条件下的 OD<sub>530</sub> 值Fig. 3.3 OD<sub>530</sub> values under different K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> additions

胶体金颗粒带负电且疏水。当溶液 pH 小于蛋白等电点时，蛋白整体带正电荷，很容易吸附到金颗粒上导致胶体金颗粒之间互相聚集而沉降；当溶液 pH 等于蛋白等电点时，蛋白整体不带电荷且非常疏水，容易吸附到金颗粒上，但往往一个蛋白周围会吸附多个金颗粒，一个金颗粒也会吸附多个蛋白，从而形成空间网状结构导致金颗粒聚集和颜色变深；当溶液 pH 略大于蛋白等电点时，蛋白整体带负电，其中碱性氨基酸因等电点相对较高而仍带正电荷，可以吸附到金颗粒表面；而酸性氨基酸带负电被排斥。这样蛋白的氨基酸序列被伸展开，有利于特异性表位的暴露。且此时接近等电点，疏水作用较强，能够更牢固的结合到金颗粒上；同时因被排斥氨基酸在外层带负电而使金标物质整体带负电，相互排斥而不会凝集，形成稳定的胶体状态。

通过目测法和光电比色法来确定抗体标记的最佳 pH。已测得胶体金原液的 OD<sub>530</sub> 值为 1.000。由图 3.3 可得，当 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 添加量为 7μL 时，OD<sub>530</sub> 值最接近胶体金原液读数，稳定性较好，无聚沉现象；因胶体金溶液对 pH 计探头有损害，因此用 pH 试纸测定该条件下的 pH 为 7.5，则最佳标记 pH 为 7.5。

### 3.3.2.2 最佳标记量的确定

在上述最佳 pH 条件下，每管分别加入 10、15、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30μL 的抗体 (0.37mg/mL)，测试最佳抗体标记量，反应结束后胶体金溶液颜

色变化情况如下图 3.4 所示；同时每管取 200 $\mu$ L 用酶标仪读取 OD<sub>530</sub> 值，结果如下图 3.5 所示。

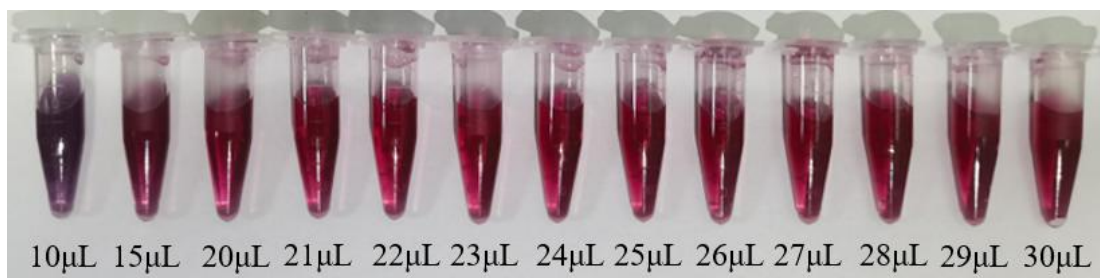


图 3.4 最佳抗体标记量的确定

Fig. 3.4 Determination of the optimal amount of antibody labeling

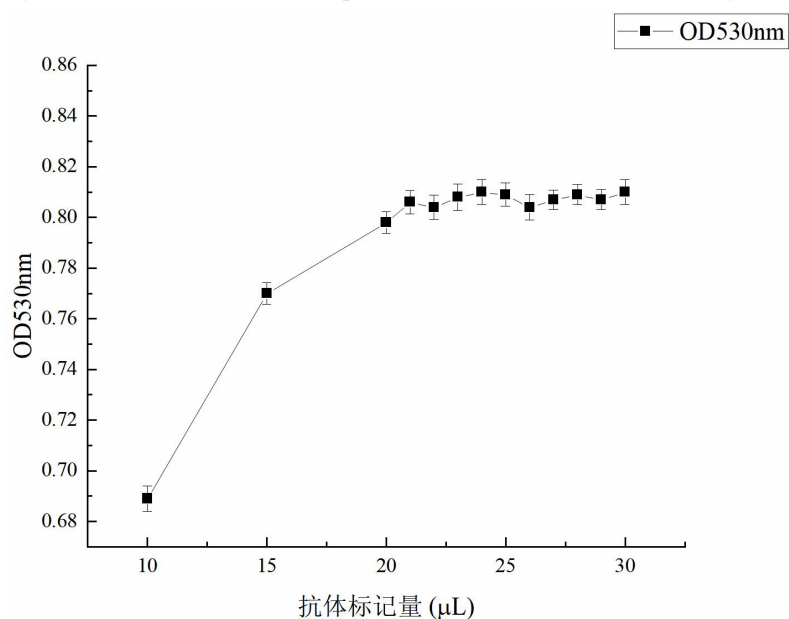


图 3.5 不同抗体标记量条件下 OD<sub>530</sub> 值

Fig. 3.5 OD<sub>530</sub> values under different antibody labeling amounts

抗体标记量的多少会影响试纸条方法的灵敏度。抗体标记量过少，虽然在阳性条件下会降低试纸条的检测限，但在阴性条件下会降低 C 线的显色甚至不显色，影响试纸条性能评价；抗体标记量过高，在阳性条件下会降低方法的灵敏度。因此需要确定合适的抗体标记量。

采用目测法和光电比色法来确定最佳抗体标记量。已测得胶体金原液的 OD<sub>530</sub> 值为 1.000。由图 3.4 可得，抗体标记量达到 20 $\mu$ L 后颜色与胶体金原液相近，在图 3.5 中可得抗体量为 20 $\mu$ L 时，OD<sub>530</sub> 值接近胶体金原液且抗体用量少，添加量超过 20 $\mu$ L 的颜色变化不大。实际金标抗体制备时，加入抗体量应为最适标记量的 120%-130%。因此最佳标记量为 20 $\mu$ L，实际抗体添加浓度为 9 $\mu$ g/mL。



### 3.3.3 T 线和 C 线的划膜浓度的确定

设计 T 线和 C 线的划膜浓度如下表 3.4 所示，在 NC 膜上划膜后利用阴性样品进行点样测试，测试结果如下图 3.6。

表 3.4 检测线和质控线划膜浓度的设计

Table 3.4 Design of test line and control line scribing concentration

检测线 质控线	检测线				
	a(4mg/mL)	b(3mg/mL)	c(2mg/mL)	d(1mg/mL)	e(0.5mg/mL)
I(0.5mg/mL)	I-a	I-b	I-c	I-d	I-e
II(1mg/mL)	II-a	II-b	II-c	II-d	II-e



图 3.6 划膜浓度测试

Fig. 3.6 Scratch Concentration Test

T 线和 C 线的包被浓度对试纸条的性能有显著影响。若 T 线包被抗原浓度较低，导致 T 线信号值低，则影响阴性结果的判定；若 T 线包被抗原浓度偏高，造成抗原浪费和检测灵敏度的降低。由图 3.6 可得，II-c 条件即检测线为 2mg/mL，质控线为 1mg/mL 时，T 线和 C 线条带显色均清晰可辨，因此确定该条件为最佳 T/C 线划膜浓度组合。

### 3.3.4 试纸条性能评价

#### 3.3.4.1 重复性

将优化后的胶体金免疫层析试纸条分别用阴性和阳性样本进行 3 次重复测试，测定情况如下图 3.7 所示。阴性条件下，试纸条的 T 线和 C 线均条带清晰，不同试纸条之间条带显色强度差异不明显；阳性条件下，试纸条均只有 C 线显色且显色强度基本一致。

说明试纸条的重复性较好。



图 3.7 试纸条的重复性测试  
Fig. 3.7 Repeatability test of test strips

### 3.3.4.2 灵敏度

将阿维拉霉素标准品设置为系列浓度溶液测试试纸条的检测限。结果如表 3.5 和图 3.8 所示，从图 3.8 中看出，当样品浓度为  $1\mu\text{g/mL}$  时，T 线颜色变浅但仍存在；而当样品浓度为  $2\mu\text{g/mL}$  及以上时，试纸条的 C 线强度正常，T 线完全消失，则  $2\mu\text{g/mL}$  为该试纸条方法的检测限。

表 3.5 试纸条的灵敏度测试 (n=3)  
Table 3.5 Sensitivity test of test strips (n=3)

样品浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	2	5	10	20
显色结果	阴性	弱阳性	阳性	阳性	阳性	阳性



图 3.8 样品中不同浓度阿维拉霉素的检测结果  
Fig. 3.8 Detection results of different concentrations of avilamycin in samples

### 3.3.4.3 特异性

利用阿维拉霉素 A 的结构类似物及其衍生化试剂来测试试纸条的特异性, 结果如表 3.6 和图 3.9 所示。由图可知本实验建立的阿维拉霉素胶体金试纸条对 1 号阿维拉霉素 B 和 2 号阿维拉霉素混合物样品有较明显的交叉反应现象, 对 3-7 号样品基本不存在交叉反应。因阿维拉霉素 B 与阿维拉霉素 A 结构极其相似, 以及阿维拉霉素混合物中含有阿维拉霉素 A, 所以表现出正常的交叉反应性; 对其他结构类似物及其衍生化试剂不存在交叉反应性。结果表明, 试纸条的特异性良好。

表 3.6 试纸条特异性测试结果 (n=3)

Table 3.6 The results of specificity test of test strips (n=3)

样品名称	阿维拉霉素 B	阿维拉霉素混合物	越霉素	扁枝衣霉素	潮霉素	Ziracin	Gavibamycin
显色情况	弱阳性	弱阳性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性



图 3.9 试纸条的特异性测试

(1) 阿维拉霉素 B (2) 阿维拉霉素混合物 (3) 越霉素 (4) 扁枝衣霉素 (5) 潮霉素 (6) Ziracin (7) Gavibamycin

Fig. 3.9 Specificity test of test strips

(1) Avilamycin B (2) Avilamycin (3) Destomycin (4) Everninomicin (5) Hygromycin (6) Ziracin (7) Gavibamycin

## 3.4 本章小结

### 3.4.1 讨论

单克隆抗体最早于 1975 年通过杂交瘤技术获得, 是一类糖基化蛋白, 一般由四条多肽链组成, 两条重链 (HC) 和两条轻链 (LC) 通过二硫键连接, 结构类似“Y”型<sup>[80]</sup>。单抗主要来源于动物腹水和杂交瘤细胞的培养上清, 其中含有大量非目的抗体蛋白和脂

类物质,因此需要进行纯化处理。目前,单克隆抗体纯化的方式可分为沉淀法和层析法。沉淀法常作为初级纯化方式,包括辛酸-硫酸铵法、聚乙二醇(PEG)沉淀法、低温有机溶剂沉淀法(辛酸法)、丙酮沉淀法、三氯醋酸沉淀法、优球蛋白沉淀法等。层析法包括:离子交换层析、凝胶过滤层析、亲疏层析、亲和层析、疏水层析、疏水电荷诱导层析等。本研究采用了辛酸-硫酸铵法和亲和层析法对腹水进行纯化。辛酸-硫酸铵法是由硫酸铵沉淀法与低温有机溶剂沉淀法相结合发展而来,经研究验证,使用辛酸-硫酸铵法较单纯的辛酸法或硫酸铵法效果好。在酸性条件加入辛酸,使 $\alpha$ 及 $\beta$ -球蛋白、清蛋白等成分沉淀,离心后取含IgG的上清加入硫酸铵,30%-50%浓度的硫酸铵能与免疫球蛋白形成沉淀,去除白蛋白、转铁蛋白等杂蛋白<sup>[81]</sup>。亲和层析法根据配基的不同可分为:Protein A/G亲和法、抗原为配基的免疫亲和法、金属离子为配基的亲和层析、蛋白质A类似物为配体的亲和层析和合成有机小分子化合物纯化法等<sup>[82]</sup>。层析法具有分离速度快、操作简单、分离条件温和、单抗纯度高和活性损失小等优点。本研究采用Protein G亲和层析法,Protein G是一种从链球菌中提取的细菌细胞壁蛋白,能与免疫球蛋白的恒定区相结合。对粗纯后样品和亲和层析后样品进行鉴定,根据电泳条带情况可得腹水纯化效果明显,亲和层析后基本无杂蛋白,单抗蛋白纯度高,可用于后续胶体金的标记。

胶体金免疫结合实验一般分为斑点免疫金渗滤试验和胶体金免疫层析试验<sup>[83]</sup>。本研究采用胶体金免疫层析技术,利用胶体金标记抗AVI单抗建立相应的试纸条检测阿维拉霉素。胶体金标记实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程<sup>[84]</sup>,标记过程受多种因素影响,如金颗粒大小、离子浓度、蛋白质用量及标记体系pH值等,其中最关键的是标记pH和蛋白质标记量。当溶液的pH等于或略大于蛋白的等电点时,蛋白整体显负电但部分碱性氨基酸残基带正电,这种状态下更有利于胶体金和蛋白的结合<sup>[48]</sup>。蛋白质用量则取决于金颗粒的大小,金颗粒直径越小,其总表面积越大就能标记更多的蛋白质<sup>[85]</sup>。常采用Mey氏稳定化试验确定能使胶体金蛋白质复合物稳定的最小蛋白标记浓度。本研究根据相同原理确定最佳抗体标记量和标记pH,以优化后条件制备胶体金-抗体偶联物。

影响胶体金免疫层析试纸条性能的因素有很多,如胶体金颗粒大小形状、胶体金质量、抗体质量、所选材料(NC膜、样品垫、结合垫、吸水垫、PVC底板)、制备工艺、试纸条制备的工作环境等。其中抗体质量的优劣直接影响试纸条的灵敏度和特异性可以通过优化抗体的来源和纯化过程,提升金标抗体质量。除了通过筛选优化试纸条各组成

部分来提高灵敏度，还有利用亲和素与生物素之间的强结合力，构建多层次信号放大系统来增强检测信号。Holgate CS 等<sup>[86]</sup>建立的免疫金银染色法，基于胶体金对银离子的还原催化作用，使得金表面沉积一层黑色的银颗粒，增强了试纸条的敏感度。利用双标记法，与酶、乳胶微粒等进行标记和双纳米金标记，增强信号而提升灵敏度。本研究建立的胶体金试纸条灵敏度有待提高，可从以上方面进行设计，优化试纸条条件以达到提高灵敏度的目的。

### 3.4.2 结论

本章主要对单克隆抗体的制备和胶体金免疫层析试纸条的建立这两方面展开研究，实验结论如下：

(1) 单克隆抗体的制备及鉴定：采用腹水诱生法获得含高浓度单抗的腹水，通过辛酸-硫酸铵法和亲和层析对其进行纯化。对纯化后样品进行 SDS-PAGE 鉴定，电泳图仅有对应抗体重链和轻链的 2 条条带，表明纯化效果良好。对腹水纯化过程进行跟踪测定，得到经辛酸-硫酸铵法纯化后单抗的蛋白回收率达 6.76%，而经亲和层析纯化的单抗蛋白回收率达 35.9%。

(2) 胶体金免疫层析试纸条的研发：利用纯化后的单抗进行胶体金标记条件的优化，根据颜色变化情况确定最佳标记 pH 为 7.5，最佳抗体添加浓度为 9 $\mu$ g/mL，以此条件制备胶体金-抗体偶联物。设计检测线和质控线的不同划膜浓度组合，用阴性样本测试条带显色情况，确定检测线为 2mg/mL，质控线为 1mg/mL。根据优化后条件组装试纸条并进行性能评价，确定检测限为 2 $\mu$ g/mL；用阴性样品和阳性样品测定多个试纸条，发现相同条件下不同试纸条条带显色强度无明显差异，证实试纸条的重复性较好；用阿维拉霉素 A 的结构类似物及衍生物测试得到试纸条的特异性较好。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

本研究根据细胞生长情况和细胞上清效价 OD 情况确定基础培养基为 DMEM/F12。通过考察不同血清浓度对细胞的影响,证实血清浓度的降低会影响细胞的生长速率和抗体分泌情况,因此采用逐级降血清浓度驯化的方式,使细胞最终适应 7.5%血清浓度的培养基。根据文献选择 6 种营养因子:乙醇胺、胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸钠、谷氨酰胺、BSA,采用试验设计对其进行种类筛选和添加浓度的优化。首先对 6 种营养因子进行单因素实验,根据间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 值初步确定各因子的浓度范围为:胰岛素 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 0~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、亚硒酸钠 5~15 $\text{ng}/\text{mL}$ 、BSA 50~150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、谷氨酰胺 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据单因素实验结果设计 Plackett-Burman 实验,每个因子取 2 水平,采用 Design-Expert 11 软件对试验结果进行方差分析,根据各因子对应的  $P$  值大小确定显著影响因子为胰岛素、转铁蛋白和乙醇胺。对这 3 个因子设计上升路径和步长,进行最陡爬坡实验,选取响应值最大时的浓度条件为后续 Box-Behnken 试验的中心点。三因素取 3 水平进行 17 次试验,以间接 ELISA 测定的细胞上清效价 OD 值为响应值,利用 Design-Expert 11 软件拟合回归方程,求得最佳浓度分别为胰岛素 8.197 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、转铁蛋白 7.522 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、乙醇胺 4.232 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,此时响应值达到最大为 1.321;绘制响应面分析图描述 3 因素两两之间的相互作用,得到胰岛素与乙醇胺之间的相互作用显著。对最优添加条件进行模型验证,结果实际值与理论预测值无显著差异,证实该模型的有效性。之后通过摇瓶放大实验,证实最优培养基条件对细胞生长和抗体分泌影响好于 12.5%血清浓度培养基条件,且摇瓶条件下抗体分泌情况较孔板培养更好。

采用腹水诱生法获取含高浓度单克隆抗体的腹水。腹水通过辛酸-硫酸铵法和亲和层析法去除多余杂蛋白,纯化单抗并用 SDS-PAGE 鉴定纯化效果,证实经两步纯化后基本无杂条带且条带清晰,说明单抗纯度明显提升,为建立胶体金免疫层析试纸条作准备。对抗体标记浓度和标记 pH 进行优化,利用比色法对测试的胶体金溶液进行读数,与胶体金原液读数相比较来判定颜色变化,从而确定抗体最佳标记量为 20 $\mu\text{L}$ ,实际抗体标

记浓度为  $9\mu\text{g/mL}$ ，最佳标记 pH 为 7.5。根据优化后条件制备胶体金-抗体偶联物。设计 T 线和 C 线的不同划膜浓度组合，用 PBS 进行测试，选择 T 线和 C 线条带均清晰的浓度组合，即 T 线  $2\text{mg/mL}$ ，C 线  $1\text{mg/mL}$ 。采用上述优化后条件建立胶体金免疫层析试纸条方法，并将各材料依次层叠进行组装。用阿维拉霉素标准溶液测试其检测限，结果为  $2\mu\text{g/mL}$ 。利用阿维拉霉素 A 的结构类似物及衍生物，对试纸条进行特异性测试，结果表明，试纸条对以上物质不存在交叉反应，说明试纸条特异性良好。利用阳性样品和阴性样品对试纸条进行重复性测试，根据相同条件下试纸条 T/C 线显色情况的一致性，说明试纸条的重复性较好。

## 4.2 创新点

本文的创新点主要表现在以下几点：

(1) 首次对抗阿维拉霉素杂交瘤细胞进行体外培养条件的优化，设计低血清培养基。筛选基础培养基，对细胞进行减血清驯化以适应低血清环境，依次通过单因素实验、Plackett-Burman 设计、最陡爬坡实验、Box-Behnken 响应面等筛选营养因子的种类及优化其添加浓度，并对最佳添加条件进行模型验证，摇瓶放大实验。为后续进一步降低血清浓度提供参考，同时为以后从细胞上清获取单抗作准备。

(2) 首次研发检测阿维拉霉素的胶体金免疫层析试纸条。确定胶体金标记抗体时的最佳抗体添加浓度和最佳标记 pH，筛选检测线和质控线的最优划膜浓度组合，建立胶体金免疫试纸条方法。测试试纸条的灵敏度，得到检测限为  $2\mu\text{g/mL}$ 。并经实验证实试纸条的特异性和重复性良好。

## 4.3 展望

本研究对抗阿维拉霉素杂交瘤细胞的体外培养条件进行优化，并对优化后培养基进行验证；通过腹水诱生获得高特异性单抗，初步建立检测阿维拉霉素的胶体金免疫层析试纸条，并进行性能评价，但由于时间限制，存在一些问题与不足以待后续改进。主要有以下方面：

(1) 体外培养体系的深入探究

本研究对杂交瘤细胞的减血清驯化不够深入，选择优化的营养因子数较少。后续可继续对细胞进行逐步驯化，减少血清带来的影响；参考相关文献和已经商用的无血清培

培养基,从血清的功能出发筛选合适的营养因子,建立极低血清甚至无血清培养基,利于实现标准化的大规模体外培养技术,并为后续从细胞上清获取单抗作铺垫。

## (2) 胶体金免疫层析试纸条灵敏度的提升

本研究建立的检测阿维拉霉素胶体金免疫试纸条在灵敏度上有待提升。胶体金颗粒作为示踪物标记抗体,有金花、金星、金球等形貌,本研究中使用的是球形金颗粒,也是使用最为广泛的。其中金纳米花比相同尺寸的金纳米球具有更好的胶体稳定性和更大的总表面积。此外,由于蛋白质对金纳米花表面的空间位阻更低,因此其较大的比表面积有利于提高抗体的固定量,有效提升试纸条的灵敏度。Ji 等<sup>[87]</sup>使用多枝金纳米花研发出超灵敏定量检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的免疫层析试纸条,在大米提取物中检测限可达到 0.32pg/mL。因此可以尝试使用金纳米花来标记抗体提升试纸条的灵敏度。

亲和素与生物素以 1:4 的比例共价结合,且结合稳定、专一性强、不受试剂浓度、pH 环境、蛋白变性剂等有机溶剂的影响<sup>[88]</sup>。亲和素和生物素的特异结合能力是抗原抗体的 100 万倍,且生物素和亲和素均可与抗体和其它大分子活性物质偶联,又可被酶、荧光素、放射性同位素和胶体金所标记<sup>[89]</sup>,可适用于构建一个多层次信号放大系统。Zhu 等<sup>[90]</sup>利用抗体和生物素化单链 DNA 与 13nm 胶体金双标记,将链霉亲和素与 41nm 胶体金标记,制备了可检测低至 1ng/L 的高敏感性心肌钙蛋白 I 的试纸条。因此可以将生物素-亲和素系统与胶体金结合,放大检测信号提高灵敏度。

除此之外,还可通过条带阅读器的利用、基于纳米金颗粒修饰纳米材料的信号增强、基于金或银的信号增强、基于双纳米金颗粒的信号增强和酶增强<sup>[91]</sup>等方法增强检测信号,达到提升灵敏度的目的。



## 参考文献

- [1] 邹君彪, 姜平. 阿维拉霉素的研究进展[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2017, 37(10): 94-97. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEhJnd3hteC16eXEyMDE3MTAwMzEaCHg1OGJ2eWhn>. DOI:10.3969/j.issn.1001-0769.2017.10.031.
- [2] S.C.KYRIAKIS, 粟寿初. 预防和(或)治疗早期断奶仔猪的主要应激性疾病的新方法[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 1989, (06): 31-32. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg5RSzAwMDAwMDg0NjMzOBoIeW1jbHM2dXE%3D>.
- [3] 郭金玲. 饲料中效美素对仔猪生产性能和经济效益的影响[J]. 安徽农业科学, 2008, (20): 8608+8618.<http://dx.doi.org/10.13989/j.cnki.0517-6611.2008.20.146>. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2008.20.146.
- [4] 邹君彪, 和玉丹, 马改彦, 等. 阿维拉霉素对肉鸡生长性能及免疫功能的影响[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(08): 69-73. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg54bXlzeTIwMjEwODAxMxoINH03bXd1YzQ%3D>.
- [5] 王湘如, 赵月, 冯家伟, 等. 欧盟禁用饲料药物添加剂的历史和法规[J]. 中国兽药杂志, 2019, 53(06): 72-79. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEhN6aG9uZ2dzeXp6MjAxOTA2MDEyGghqazR6a2Z3bw%3D%3D>. DOI:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.12.
- [6] ANNE P M, EWEN M, RANDAL B, et al. Efficacy of avilamycin for the prevention of necrotic enteritis caused by a pathogenic strain of *Clostridium perfringens* in broiler chickens[J]. *Avian pathology : journal of the WVPA*, 2016, 45(3). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2016/SJPDBF2CDBF34E6EC51C4BF885E2A06DC783>. DOI: 10.1080/03079457.2016.1165793.
- [7] 宇光海, 彭海芬, 王翱宇. 阿维拉霉素生物合成研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(01): 94-102. <http://dx.doi.org/10.13523/j.cb.2009022>. DOI:10.13523/j.cb.2009022.
- [8] MERTZ J L, PELOSO J S, BARKER B J, et al. Isolation and structural identification of nine avilamycins[J]. *The Journal of antibiotics*, 1986, 39(7): 877-887. <http://dx.doi.org/10.7164/antibiotics.39.877>. DOI:10.7164/antibiotics.39.877.
- [9] ARENZ S, JUETTE M F, GRAF M, et al. Structures of the orthosomycin antibiotics avilamy

- cin and evernimicin in complex with the bacterial 70S ribosome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(27): 7527-7532. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1604790113>. DOI:10.1073/pnas.1604790113.
- [10] 陈永辉, 刘波, 曾兆国, 等. 阿维拉霉素的研究进展[J]. 饲料工业, 2007, 28(14): 9-11. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1001-991X.2007.14.003>. DOI:10.3969/j.issn.1001-991X.2007.14.003.
- [11] 胡向东, 冯云会, 叶茂, 等. 随机诱变和基因组重排选育阿维拉霉素高产菌[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(07): 1-7. <http://dx.doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.019154>. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.019154.
- [12] B K C, BIRTE V. Interaction of avilamycin with ribosomes and resistance caused by mutations in 23S rRNA[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2002, 46(11). [https://schlr.cnki.net/z/detail/index/GARJ0010\\_3/SJPD12090203008070](https://schlr.cnki.net/z/detail/index/GARJ0010_3/SJPD12090203008070). DOI: 10.1128/AAC.46.11.3339-3342.2002.
- [13] KRUPKIN M, WEKSELMAN I, MATZOV D, et al. Avilamycin and evernimicin induce structural changes in rProteins uL16 and CTC that enhance the inhibition of A-site tRNA binding [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(44): E6796-E6805. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1614297113>. DOI:10.1073/pnas.1614297113.
- [14] 梁新乐, 陈敏, 张虹, 等. <sup>60</sup>Co γ 射线诱变阿维拉霉素筛选高产菌株及培养基优化[J]. 核农学报, 2007, (05): 451-455. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg1obnhiMjAwNzA1MDA2GghmcmliaHYyNw%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1000-8551.2007.05.006.
- [15] 刘芳, 李晓荣, 邹祥. 阿维拉霉素生物合成与代谢调控研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, (12): 25-30. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg1zdzpzdGlyMDEwMTIwMDUaCGw0aXc3cHM3>.
- [16] H. R, WELLENREITER, 代建国, 等. 阿维拉霉素对肉仔鸡生产性能的影响[J]. 饲料研究, 2001, (02): 33-34. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg1zbHlqMjAwMTAyMDE1GggzOWI1ZW16NA%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1002-2813.2001.02.015.
- [17] 潘淑媛. 阿维拉霉素对肉鸡盲肠产气梭状芽胞杆菌的数量及生长性能的作用[J]. 饲料研究, 2002, (06): 27-28. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg1zbHlqMjAwMjA2MDEyGghsdDQ0Zm4zMg%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1002-2813.2002.06.027.

- 02.06.012.
- [18] 梁先明, 汤树生. 阿维拉霉素预混剂对肉鸡的坏死性肠炎的药效试验[J]. 中国兽医杂志, 2006, (12): 17-18. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg96Z3N5enoyMDA2MTIwMDYaCHVicDduZmxo>. DOI:10.3969/j.issn.0529-6005.2006.12.006.
- [19] 孔祥书, 李春群, 刘金章, 等. 不同药物添加剂对生长猪生产性能的影响[J]. 饲料研究, 2004, (1): 24-25. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg1zbHlqMjAwNDExMDA4GggydHMwenNpYw%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1002-2813.2004.1.008.
- [20] 沈顺新, 任银娥. 不同抗生素对仔猪的促生长效果[J]. 中国动物保健, 2006, (04): 39-40. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg96Z2R3YmoyMDA2MDQwMjEaCG8ybW5vdTZs>. DOI:10.3969/j.issn.1008-4754.2006.04.021.
- [21] 潘镇涛, 林凌, 郑雪媚, 等. HPLC 法测定阿维拉霉素预混剂中阿维拉霉素的含量[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(12): 157-159. <http://dx.doi.org/10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2017.12.063>. DOI:10.16377/j.cnki.issn1007-7731.
- [22] 魏德宝, 鲍恩东. 饲料中阿维拉霉素含量反相 HPLC 检测方法的建立[J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(03): 99-103. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEhFuam55ZHh4YjIwMTAwMzAxORoIY2IwODY5ODk%3D>.
- [23] 段东郁. 高效液相色谱-质谱技术在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2021, (28): 143-144. <http://dx.doi.org/10.16043/j.cnki.cfs.2021.28.080>. DOI:10.16043/j.cnki.cfs.2021.28.080.
- [24] SAITO-SHIDA S, HAYASHI T, NEMOTO S, et al. Determination of total avilamycin residues as dichloroisovernic acid in porcine muscle, fat, and liver by LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2018, 249. <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2018/SJES8E8917A3580C9239CC148AE9BEC0F56D>. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.003.
- [25] HO C, WONG Y-T. Determination of avilamycin as dichloroisovernic acid in poultry and porcine muscles by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(26): 8633-8643. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-013-7262-x>. DOI:10.1007/s00216-013-7262-x.
- [26] FORMICA G, GIANNONE C. Gas chromatographic determination of avilamycin total residues in pig tissues, fat, blood, feces, and urine[J]. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 2004, 87(12): 2000-2004. DOI:10.1002/jao.10000.

- mists, 1986, 69(5): 763-766. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3771448>.
- [27] AMELIN V G, KRASNOVA T A. Identification and determination of antibiotics from various classes in food- and feedstuffs by matrix-or surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2015, 70(7). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2015/SSJDBBCBE82B1DD8C6056A1AD54D775A9826>. DOI: 10.1134/S1061934815070023.
- [28] 王晟. 新型基质辅助激光解吸离子化质谱方法在生物样品快速和高灵敏检测中的应用研究[D]. 吉林大学, 2018. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFDLAST2018&filename=1018217991.nh&uniplatform=NZKPT&v=0f6hQj7s4odHfTMrXKNUIc6f4kFO8dkxWe266mmH45A7vUSsyJE9IKn4JGRRcOPI>.
- [29] 李霞. 微生物检定法在抗生素质控分析中的应用[J]. 中国药业, 2004, (09): 21-23. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg16Z3I5MjAwNDA5MDE5Ggh6emxrczI1aQ%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1006-4931.2004.09.019.
- [30] 袁霞. 阿维拉霉素在鲤体内药代动力学和残留研究[D]. 华中农业大学, 2006. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDESCFkxMDA0NzU2Ggh6aXF0cDUyag%3D%3D>. DOI:10.7666/d.y1004756.
- [31] ZHOU L, CHEN G, CHEN M, et al. Development of a highly sensitive monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avilamycin in feed [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2022: 1-11.<http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2021.2017003>. DOI:10.1080/19440049.2021.2017003.
- [32] 朱晓黎. 兔骨髓瘤细胞和杂交瘤细胞的无血清培养驯化研究[D]. 浙江大学, 2017. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDESCFkzMzewMTg3Ggh5YXdocWV1ag%3D%3D>.
- [33] 卢晓, 凌志洋, 孙兵. 单克隆抗体制备技术研究进展[J]. 国际生物制品学杂志, 2018, 41(05): 220-224. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEhtnd3I4LXlmemR6bHlzd3pwZmMyMDE4MDUwMDMaCHZlc3ljeDdo>. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4211.2018.05.003.
- [34] 孙静静, 周伟伟, 周雷鸣, 等. 杂交瘤细胞体外大规模培养研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(10): 82-89. <http://dx.doi.org/10.13523/j.cb.20181010>. DOI:10.13523/j.cb.20181010.

- [35] 商瑜, 张启明, 李悦, 等. 动物细胞无血清培养基的发展和应用[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2015, 43(04): 68-72. <http://dx.doi.org/10.15983/j.cnki.jsnu.2015.04.344>. DOI:10.15983/j.cnki.jsnu.2015.04.344.
- [36] 郭芳睿, 秦俊红, 李彦霖, 等. 细胞无血清培养现状概述[J]. 生物技术通讯, 2017, 28(06): 865-870. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg9zd2pzdHgyMDE3MDYwMzAaCGI2OHpqOWkz>. DOI:10.3969/j.issn.1009-0002.2017.06.030.
- [37] 李伟风, 樊振林, 张涸瑜, 等. 用于重组蛋白药物生产的CHO细胞无血清培养基的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 43(04): 905-916. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEhB4YnN3eHp6MjAyMTA0MDI1Gghvdm01NWpkdg%3D%3D>. DOI:10.11844/cjcb.2021.04.0025.
- [38] 董关木. 细胞培养用牛血清现状与进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, (09): 697-700. <http://dx.doi.org/10.13200/j.cjb.2007.09.70.donggm.022>. DOI:10.13200/j.cjb.2007.09.70.donggm.022.
- [39] 石嘉琛, 王家敏, 乔自林. 动物血清的成分及在细胞培养中的作用[J]. 甘肃畜牧兽医, 2020, 50(10): 12-14+19. <http://dx.doi.org/10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2020.10.002>. DOI:10.15979/j.cnki.cn62-1064/s.2020.10.002.
- [40] 王永民, 陈昭烈. 动物细胞无血清培养基的研究与设计方法[J]. 中国生物工程杂志, 2007, (01): 110-114. <http://dx.doi.org/10.13523/j.cb.20070121>. DOI:10.13523/j.cb.20070121.
- [41] 段盼盼. Vero 细胞无血清培养基的研制及其在流感病毒培养中的应用[D]. 北京协和医学院, 2015. [https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDEyMDESCFkyODE4MzQ2Ggg5YW5rZWFudA%3D%3D](https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDESCFkyODE4MzQ2Ggg5YW5rZWFudA%3D%3D). DOI:10.7666/d.Y2818346.
- [42] 陈小东. 用于 CIK 细胞体外扩增的血清替代物的开发[D]. 华东理工大学, 2016. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&dbname=CMFD201701&filename=1017040447.nh&uniplatform=NZKPT&v=nX69YriSuH4JBUvbGP4g1kQZxErIGL3VHL1kTs1vyMAemJBAMYCXifsTbDxDrTI>.
- [43] 张香玲, 李薇. Vero 细胞无血清培养基的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(02): 67-72. <http://dx.doi.org/10.13309/j.cnki.pmi.2015.02.016>. DOI:10.13309/j.cnki.pmi.2015.02.016.
- [44] 王忠兴, 郭玲玲, 匡华. 食品安全免疫层析检测技术研发及应用进展[J]. 生物产业技术, 2019, (04): 75-81. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg9zd2N5anMyMDE5MDQwMTIaCGJ0dXN4ZWE5>. DOI:10.3969/j.issn.1674-0319.2019.04.01

- 1.
- [45] LAURA A, FABIO D N, ALIDA R, et al. Silver and gold nanoparticles as multi-chromatic lateral flow assay probes for the detection of food allergens[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2018, 411(9). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2018/SJPD0725952EE74C62169195F6AF595C0779>. DOI: 10.1007/s00216-018-1451-6.
- [46] 孟东, 陈蕾, 王波, 等. 胶体金免疫层析试纸条在食品安全检测中的研究进展[J]. 广州化工, 2021, 49(11): 14-17. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEglnemhnMjAyMTEExMDA2Ggh2c3JtZ21iag%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1001-9677.2021.11.006.
- [47] 闫灵芝. 免疫层析试纸条技术在食品安全领域的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 397-404. <http://dx.doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020110079>. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020110079.
- [48] 朱芳菲. 金刚烷胺的新型酶联免疫吸附方法的建立和胶体金免疫层析检测卡的研发[D]. 南昌大学, 2018. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyAyMTEyMDESCUQwMTUyMTcyMBoIZ2E2Mnk5dGs%3D>.
- [49] 王圆. 亚洲梨火疫病病菌胶体金免疫层析检测试纸条的研制[D]. 南京农业大学, 2019. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyAyMTEyMDESCFkzODIwNTY1GghvbHY0N253bQ%3D%3D>.
- [50] 吴海波, 邵军军, 常惠芸. 免疫层析快速诊断试纸条在动物疾病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2005, (08): 46-48. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg96Z2R3ankyMDA1MDgwMzAaCDUza3hzcGE2>. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2005.08.030.
- [51] 赵越, 白云, 刘立元, 等. 利用重组表位蛋白 map0862-2154c 检测牛副结核血清抗体胶体金免疫层析方法的建立(英文)[J]. 中国兽医学报, 2018, 38(01): 133-141. <http://dx.doi.org/10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.01.21>. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.01.21.
- [52] 孙涛, 高瑞刚, 孙明君, 等. 鱼类病毒性出血性败血症病毒诊断胶体金免疫层析方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(12): 92-97. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEg96Z2R3ankyMDE3MTIwMjYCG45dmxyanFw>. DOI:10.3969/j.issn.1005-944X.2017.12.026.

- [53] YOUXUE W, MEIJIAO W, CHENG L, et al. Colloidal gold immunochromatographic test strips for broad-spectrum detection of Salmonella[J]. Food Control, 2021, 126. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsRU5HTmV3UzIwMjIwMzIyEiBjMmI5MDJmZjBjMTQ3ZWQ2N2JlZTI5NTA0NWJiZjIyYXoIbXRuNXU5amU%3D>. DOI:10.1016/j.foodcont.2021.108052.
- [54] 何方洋, 万宇平, 崔廷婷, 等. 谷物中玉米赤霉烯酮残留的胶体金免疫层析法测定[J]. 食品工业, 2019, 40(05): 308-311. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzAyEglzcGd5MjAxOTA1MDc0GggycmR3NXcxbA%3D%3D>.
- [55] 章先, 付子贤, 周一钊, 等. 赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮-二联胶体金免疫层析试纸条的制备及应用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(05): 1235-1245. <http://dx.doi.org/10.13344/j.microbiol.china.180407>. DOI:10.13344/j.microbiol.china.180407.
- [56] V. B A, E. U A, V. P A, et al. Highly sensitive lateral flow test with indirect labelling for zearalenone in baby food[J]. Food and Agricultural Immunology, 2020, 31(1). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2020/STJDC65F8451F7E5DC74083EE4C2D13AAFAA>. DOI: 10.1080/09540105.2020.1750570.
- [57] 杨晶祎. 汞(II)和菊酯类农药的胶体金检测技术研究[D]. 南京农业大学, 2014. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDESCFkyOTc0OTM3Ggh2cjV2bXh3Yg%3D%3D>.
- [58] YANG, ZHANG, WANG, et al. Development of a colloidal gold-based strip test for the detection of chlorothalonil residues in cucumber[J]. Food and Agricultural Immunology, 2015, 26(5). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2015/STJD9AF86BAB27291073DAABE29795864B65>. DOI: 10.1080/09540105.2015.1018875.
- [59] YONG X, QIMING K, QI S, et al. Development and validation of an immunochromatography test strip for rapid detection of pyrimethanil residues[J]. Food and Agricultural Immunology, 2020, 31(1). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2020/XJAZF52B7755DE9B10106A1AC43A86F404EE>. DOI: 10.1080/09540105.2020.1733496.
- [60] PEI X, WANG Q, LI X, et al. Provision of Ultrasensitive Quantitative Gold Immunochromatography for Rapid Monitoring of Olaquinox in Animal Feed and Water Samples[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(7). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2016/SSJD77E77A190963D2D333E44EA33E9E40EA>. DOI: 10.1007/s12161-015-0360-y.

- [61] WU Y, GUO S, DONG Q, et al. Development of an Immunochromatographic Test Strip for Rapid Simultaneous Detection of Enrofloxacin and Ofloxacin in Tissue of Chicken Muscle and Pork[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(10). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2016/SSJD6972A6AFE5F23350EA99AEA08B96BC4F>. DOI: 10.1007/s12161-016-0474-x.
- [62] XIE Y, ZHANG L, LE T. An immunochromatography test strip for rapid, quantitative and sensitive detection of furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in animal tissues[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017, 28(3). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2017/STJD F5456A8D47254E9D80ECEB005DF0C45C3>. DOI: 10.1080/09540105.2017.1293013.
- [63] SHUYUAN D, HONG L, JIANXIN S, et al. Nano-gold capillary immunochromatographic assay for parvalbumin[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014, 406(26). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2014/SJPD1115D7040FDEA366396F8644928E4F52>. DOI: 10.1007/s00216-014-8093-0.
- [64] 刘悦. 食物过敏原胶体金免疫层析检测试纸条的研制[D]. 天津科技大学, 2015. <https://d.wanfangdata.com.cn/thesis/ChJUaGVzaXNOZXdTmJyMTEyMDESCFkzMDMwOTM2GghkMmtzbHlmcw%3D%3D>.
- [65] 赵小旭, 柳家鹏, 柴艳兵, 等. 胶体金免疫层析法快速检测乳制品中重金属离子铅[J]. 粮食科技与经济, 2018, 43(03): 51-54. <http://dx.doi.org/10.16465/j.gste.cn431252ts.20180308>. DOI:10.16465/j.gste.cn431252ts.20180308.
- [66] HIDEKAZU A, KATSUO N, YASUKO Y, et al. Development of quantitative immunochromatographic kit and visual screening immunoassay strip for cadmium[J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2016, 408(22). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2016/SJPD3B1DE4B63287AAB608B912B225A9037A>. DOI: 10.1007/s00216-016-9475-2.
- [67] LIU X, XIANG J-J, TANG Y, et al. Colloidal gold nanoparticle probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of chromium ions in water and serum samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 745. <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2012/SJESBCD60436A21E1C78BEA0A68D40382620>. DOI: 10.1016/j.aca.2012.06.029.
- [68] 陈华龙, 蓝献泉, 刘旺培, 等. 保健食品中违法添加双氯芬酸钠免疫层析筛查方法的建立[J]. 中南药学, 2017, 15(10): 1434-1437. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEg16bnl4MjAxNzEwMDIxGggzdFrb3oyYg%3D%3D>. DOI:10.7539/j.iss



- n.1672-2981.2017.10.021.
- [69] 汤轶伟, 焦雪晴, 崔芷萌, 等. 牛奶中三聚氰胺残留胶体金免疫层析快速检测方法研究[J]. 渤海大学学报(自然科学版), 2019, 40(02): 113-118.<http://dx.doi.org/10.13831/j.cnki.issn.1673-0569.2019.02.003>. DOI:10.13831/j.cnki.issn.1673-0569.2019.02.003.
- [70] HAIHUAN X, YINGYING L, JIN W, et al. Broad-specific immunochromatography for simultaneous detection of various sulfonyleureas in adulterated multi-herbal tea[J]. Food Chemistry, 2022, 370. [https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2021\\_2/SJES046D6268088079BB34796CE7516D474C](https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2021_2/SJES046D6268088079BB34796CE7516D474C). DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.131055.
- [71] 张延, 严晓菊, 孙越, 等. 中国抗生素滥用现状及其在环境中的分布情况[J]. 当代化工, 2019, 48(11): 2660-2662+2666.<http://dx.doi.org/10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2019.11.050>. DOI:10.13840/j.cnki.cn21-1457/tq.2019.11.050.
- [72] 万遂如. 关于我国畜牧业生产中限制抗生素的使用问题[J]. 养猪, 2017, (01): 1-5.<http://dx.doi.org/10.13257/j.cnki.21-1104/s.2017.01.001>. DOI:10.13257/j.cnki.21-1104/s.2017.01.001.
- [73] 蔡萍, 吴展元, 李金荣. 体外培养技术及其在头颈部鳞状细胞癌研究中的应用[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(5): 311-314.<http://dx.doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2004.05.025>. DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2004.05.025.
- [74] 张大鹤, 易小萍, 张元兴, 等. 适于重组 CHO 细胞培养的无血清培养基的制备[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(10): 1152-1156.<http://dx.doi.org/10.13200/j.cjb.2011.10.37.zhangdh.017>. DOI:10.13200/j.cjb.2011.10.37.zhangdh.017.
- [75] 吴宏梅, 刘帅, 包阿东, 等. 不同胎牛血清对动物细胞体外培养的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(04): 96-99. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzlwMjIwMzIyEg96Z3htc3kyMDA5MDQwMjlaCGxhcHVpbWdw>.
- [76] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, (03): 91-94.<http://dx.doi.org/10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2001.03.023>. DOI:10.16433/j.cnki.issn1673-2383.2001.03.023.
- [77] 代志凯, 张翠, 阮征. 试验设计和优化及其在发酵培养基优化中的应用[J]. 微生物学通报, 2010, 37(06): 894-903.<http://dx.doi.org/10.13344/j.microbiol.china.2010.06.015>. DOI:10.13344/j.microbiol.china.2010.06.015.
- [78] BEZERRA M A, SANTELLI R E, OLIVEIRA E P, et al. Response surface methodology (RS

- M) as a tool for optimization in analytical chemistry[J]. *Talanta*, 2008, 76(5). [https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ0010\\_4/SJES38AD097D403DED1F56CD770AFD5074C6](https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ0010_4/SJES38AD097D403DED1F56CD770AFD5074C6). DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.019.
- [79] WITEK-KROWIAK A, CHOJNACKA K, PODSTAWCZYK D, et al. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of bi osorption process[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 160. <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2014/SJES14021300037592>. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.021.
- [80] 陈飞. DHFR-CHO 细胞无血清培养基及其关键组份的研究和应用[D]. 华东理工大学, 2012. [http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD1214&filename=1012338225.nh&uniplatform=NZKPT&v=a3pAg-2pLxeRQ2oIulmxnIt7XDuB14OsbNAyNY\\_vA4-07m2jAS73oqpWoLiF7cV3](http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFD1214&filename=1012338225.nh&uniplatform=NZKPT&v=a3pAg-2pLxeRQ2oIulmxnIt7XDuB14OsbNAyNY_vA4-07m2jAS73oqpWoLiF7cV3).
- [81] 汪立法. 单克隆抗体纯化技术研究进展[J]. *黑龙江科技信息*, 2016, (24): 151. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEhBobGpranh4MjAxNjI0MTQ0Ggg5cnBseXQ3OA%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1673-1328.2016.24.144.
- [82] 甘丽晶, 刘晓波, 胡质毅. 抗体分离纯化技术研究进展[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(04): 461-464. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEhBqeXl4eWxjMjAxMzA0MDQyGghoc3BnNmxcA%3D%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.04.042.
- [83] 张静静, 崔晓辰. 胶体金技术在免疫检测中的应用[J]. *江苏科技信息*, 2014, (17): 44-45. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEg9qc2tqeHgyMDE0MTcwMTkaCDR2N3k0ajRj>. DOI:10.3969/j.issn.1004-7530.2014.17.019.
- [84] 聂玉梅, 刘中成, 王佳伦, 等. 胶体金标记技术及原理[J]. *养殖技术顾问*, 2012, (06): 174. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEg95empzZ3cyMDEyMDYxNjgaCDdoMTkyYTJ2>. DOI:10.3969/j.issn.1673-1921.2012.06.16.
- [85] 姜先荣, 杨杰. 胶体金标记蛋白及应用[J]. *安徽教育学院学报(自然科学版)*, 1998, (02): 60-61. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEhI2NjU3NDg4NjYxOTk4MDIwMjUaCDdsYW0yMW83>.
- [86] Holgate C S, Jackson P, Cowen P N, et al. Immunogold — silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity [J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*,

- 1983, 31(7): 938-944. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0020579131&doi=10.1177%2f31.7.6189883&partnerID=40&md5=f15e79a0e9de1eb8ed18d991055edd3a>. DOI:10.1177/31.7.6189883.
- [87] JI Y, REN M, LI Y, et al. Detection of aflatoxin B1 with immunochromatographic test strips: Enhanced signal sensitivity using gold nanoflowers[J]. *Talanta*, 2015, 142: 206-212.<http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.048>. DOI:10.1016/j.talanta.2015.04.048.
- [88] 赵晓明. 改进胶体金免疫层析检测灵敏度的方法[J]. *技术与市场*, 2019, 26(10): 18-21. <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/ChlQZXJpb2RpY2FsQ0hJTmV3UzIwMjIwMzIyEg5qc3IzYzIwMTkxMDAwORoIeXlxc3pjdjg%3D>. DOI:10.3969/j.issn.1006-8554.2019.10.005.
- [89] 刘石锋, 陈倩, 洪广成, 等. 生物素-亲和素系统的应用研究进展[J]. *生物技术*, 2018, 28(05): 503-507.<http://dx.doi.org/10.16519/j.cnki.1004-311x.2018.05.0087>. DOI:10.16519/j.cnki.1004-311x.2018.05.0087.
- [90] JIMIN Z, NENGLI Z, DANIAN Z, et al. Simultaneous detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin by modified sandwich lateral flow immunoassay: proof of principle[J]. *Clinical chemistry*, 2011, 57(12). <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2011/SJPDD0AAF22F547FBACF522169D7DC621800>. DOI: 10.1373/clinchem.2011.171694.
- [91] HUANG X, AGUILAR Z P, XU H, et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 75. <https://schlr.cnki.net/zn/Detail/index/GARJ2016/SJESBC3209CDC6C0857B3D3120C18888D3F6>. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.032.

## 致谢

转眼间三年研究生学习生涯即将结束，每次想到都会感到不真实，时间过得如此飞快。这3年的学习生涯收获颇多，不仅是学识上的进步，更是友情、师生情等的收获。3年前初入实验室，没有接触过相关领域的知识，实验操作也知之甚少，在老师和师姐们的帮助下渐渐了解实验室，了解自己所研究的方向。如今又到了毕业季，这次将是我离开校园走进社会职场。

首先，我要感谢我的导师陈敏教授。我深知自己内向的个性，不善与人沟通，但老师在这3年中一直保持耐心，细心指导我的实验，也关心我的生活。在研究生生涯中的迷茫阶段，也是老师引领我找到正确的方向，感谢老师的不懈教导。陈老师学识渊博，对于我们实验中出现问题都能一一解答，提出多种解决方案；待人宽容亲切，与我们学生间相处融洽。再次感谢陈老师在研究生期间的指导与陪伴，希望您身体健康，诸事顺利顺心。

感谢陈贵芬师姐在我实验和学业上的指导帮助。在刚入实验室时，是师姐带领我了解实验室各仪器，亲手教我做实验，让我渐渐能独自进行实验，对我知无不言。转眼3年过去，希望她升职加薪，生活如意。

感谢李红梅师姐在这3年对我实验上的指导。虽然不是相同的研究方向，但师姐知识面广且实际操作经验丰富，对仪器也很了解，因此常常能从她那获得帮助，是我们实验室不可或缺的一分子。祝师姐一切都好。

感谢我的师弟游梦思、师妹王冰清、师弟王康和师妹吴江雪的帮助与支持。感谢他们平时在实验上的帮助，营造了良好的实验室氛围。祝他们都能研究顺利，成功毕业。

感谢我的室友们程林林、何菲和申屠慧飞在生活上的陪伴，寝室氛围愉快，能互诉烦恼减轻压力，能认真倾听陪伴。祝她们未来可期，前途无量。

感谢我的父母亲，在生活和学习上默默支持我，关心我，感谢他们一直以来的陪伴，希望他们健康无忧，一直相伴到老。

最后，感谢所有曾在生活中帮助过我的老师、同学、朋友，希望你们生活幸福，心想事成。

## 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得浙江工商大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：周磊

导师签名：叶政

签字日期：2022年5月23日

签字日期：2022年5月23日

## 关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解浙江工商大学有关保留、使用学位论文的规定：浙江工商大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

本论文提交  即日起 /  半年 /  一年以后，同意发布。

“内部”学位论文在解密后也遵守此规定。

学位论文作者签名：周磊

导师签名：叶政

签字日期：2022年5月23日

签字日期：2022年5月23日