

双抗体夹心酶联免疫法检测不同样品中的蓖麻毒素

郎立伟^{1,2}, 王玉霞^{*}, 王晨宇¹, 赵宇¹, 贾培媛¹, 傅风华²

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 目的 应用酶联免疫吸附分析方法 (ELISA) 检测待测样品中的蓖麻毒素。方法 用蛋白 G 亲和层析柱纯化蓖麻毒素单克隆抗体 (4C13 3D74 5E4 和 5H6), 以 3D74 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 4C13 建立的双抗体夹心 ELISA 对含有蓖麻毒素的多种样品进行检测。结果 抗蓖麻毒素的单克隆抗体经亲和层析纯化后具有较高的蛋白纯度, 应用 HRP 标记的 4C13 与 3D74 建立双抗体夹心 ELISA, 对于溶解于磷酸缓冲液中的蓖麻毒素标准品的检测灵敏度可达 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 对于土壤、面粉、牛奶、咸菜汁、雪碧、可乐和腐乳汁中的蓖麻毒素样品检测的灵敏度为 $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 与磷酸缓冲液样品相比较, 含有相同浓度蓖麻毒素的小鼠和人血清样品 ELISA 的阳性结果明显减弱。结论 双抗体夹心酶联免疫法能够有效用于含有蓖麻毒素样品的检测分析。

关键词: 蓖麻毒素; 双抗体夹心; 酶联免疫吸附分析

中图分类号: R991 文献标识码: A 文章编号: 1674-0440(2009)01-0012-05

Determination of ricin by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay in different samples

LANG Liwei^{1,2}, WANG Yuxia¹, WANG Chenyu¹, ZHAO Yu¹, JIA Peiyuan¹, FU Fenghua²

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract Objective To develop a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of ricin. **Methods** Anti-ricin monoclonal antibodies (4C13 3D74 5E4 and 5H6) were purified on Protein G Sepharose 4 Fast Flow Column. Antibody 4C13 labeled with horseradish peroxidase (HRP) was used to establish the ELISA with 3D74 for ricin detection. **Results** The antibodies against ricin were highly purified. The double antibody sandwich ELISA was a very sensitive method for the detection of ricin containing sample. The ricin detection limit could be as low as $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in PBST and $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ in the solution of soil flour, milk, pickle, Sprite, Cola and preserved bean curd juice. The absorbance of ELISA for the ricin in mouse serum or human serum sample was lower than that in PBST. **Conclusion** The double antibody sandwich ELISA is a sensitive method for the analysis of ricin containing sample.

Key words ricin; double antibody sandwich method; enzyme-linked immunosorbent assay

蓖麻毒素 (ricin) 是一种 II 型核糖体失活蛋白, 相对分子质量为 66 ku, 由 2 个多肽链组成, A 链、B 链以二硫键相连, 理化性质稳定^[1,2]。作为蛋白合

成抑制剂, 蓖麻毒素具有毒性极强、中毒途径多、潜伏期长、性质稳定、制备容易、无特效解毒药^[3,4]等特点, 其吸入或注射的成人致死量为 $5 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 进入体内后, 蓖麻毒素 B 链上的半乳糖结合位点与细胞表面含末端半乳糖残基的受体结合, 毒素分子内陷进入细胞, 链间二硫键被还原, 游离出 A 链。A 链是一种蛋白酶, 作用于核糖体 60S 亚单位的 28S rRNA, 使其脱腺嘌呤, 丧失对 RNA 酶的抗性而被降解导致蛋白

收稿日期: 2008-09-25

作者简介: 郎立伟, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 生化药理,

Tel 010-66931645, E-mail lang3513@163.com

* 通讯作者: 王玉霞, 女, 副研究员, 研究方向: 生化药理, Tel 010-

66931645, E-mail wangyuxia1962@hotmail.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

质合成的抑制,最终细胞死亡^[4,5]。

蓖麻毒素在蓖麻籽中含量高,可达重量的 1% ~ 5%^[6],制备工艺简单,易被恐怖分子用于恐怖袭击。因此,建立蓖麻毒素的检测方法,对染毒样品进行有效、准确的检测,对于蓖麻毒素污染样品的检测及中毒人员的临床诊断等具有重要的意义。

根据蓖麻毒素的理化性质和免疫原性已建立了多种检测方法。仪器分析方法多根据毒素的理化性质,如毛细管电泳结合基质辅助激光解吸附电离质谱法等,具有灵敏度高,样品用量少等特点,但仪器昂贵,普及困难,难以进行现场快速分析^[7]。根据毒素的抗原特性建立的免疫分析方法包括放射免疫分析、免疫 PCR、酶联免疫吸附分析(ELISA),免疫层析法和电化学生物传感器等^[8],放免分析和免疫 PCR 具有较高的检测灵敏度,但是要求在专业实验室进行,而且检测需要专业技术人员操作。生物传感器操作快速,然而检测灵敏度差异较大,干扰因素多。蓖麻毒素快速检测试纸是根据胶体金免疫层析原理,其检测灵敏度高,操作简便快速^[9],适用于污染源、部分食品中毒素的检测分析,然而多种样品本身对此方法存在严重的干扰,易形成假阳性结果,因此需要一种操作快速、在普通实验室即可进行的检测分析方法对这些样品进行分析,以补充检测试纸的不足。

本实验通过蓖麻毒素单克隆抗体(mAb)作用的表位分析,参照郭建巍等^[10]的蓖麻毒素分析方法,选择作用于毒素连续性抗原表位的 mAb 4C13 作为辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体,以作用于毒素构象表位的 mAb 3D74 为包被抗体,通过优化检测条件,建立 ELISA 方法检测了对于毒素检测试纸存在干扰的多种样品。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

蓖麻毒素由军事医学科学院毒物药物研究所毒物分析实验室提供;抗蓖麻毒素 mAb 4C13、3D74、5E4 和 5H6 腹水由军事医学科学院基础医学研究所制备;蛋白 G-Sepharose 4 Fast Flow 柱(瑞典 Amersham 公司);HRP(北京欣经科生物技术公司);牛血清白蛋白(BSA,北京元亨圣马生物技术研究所);N-四甲基联苯胺(TMB,北京中杉金桥生物技术公司)。小鼠血清取自昆明种雌性小鼠(体重 26~28 g 摘除眼球取血,血液 4℃凝固后 500×g 离心 5

min 取血清备用);人血清为中国人民解放军 307 医院提供的健康成人血清。Labsystem Multiskan MCC/340 酶标仪(芬兰),UV-250 型分光光度计(日本岛津公司),TG16W 高速离心机(长沙平凡仪器厂)。

1.2 蛋白 G 亲和层析纯化蓖麻毒素单克隆抗体

参照林清华等^[11]方法,以蛋白 G-Sepharose 4B 纯化蓖麻毒素 mAb。将腹水 10 000×g 离心 5 min,取上清过滤后同等体积结合缓冲液(pH 7.4)混合,于 4℃,蛋白 G-Sepharose 4B 层析柱反复上样 5 次,以结合缓冲液洗脱杂蛋白至基线后继续冲洗约 10 个床体积,以洗脱液(0.1 mol·L⁻¹ glycine-HCl, pH 2.7)洗脱抗体,收集抗体迅速以中和液(1.0 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.0)调节 pH 约为 7.5 以结合缓冲液 4℃透析。用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析抗体纯度。

1.3 辣根过氧化物酶标记单克隆抗体 4C13

采用简易过碘酸钠法标记抗体^[12]。在 5 mL 烧杯中将 HRP 5 mg 溶解于 1 mL 蒸馏水中,加入 0.2 mL 新配制 0.1 mol·L⁻¹ NaD₄ 溶液,室温下避光电磁搅拌 20 min。将上述溶液装入透析袋中,用 1 mmol·L⁻¹ pH 4.4 的醋酸钠缓冲液 4℃透析过夜,其间换液 3 次。加入 0.2 mol·L⁻¹ pH 9.5 的碳酸盐缓冲液,调节醛化 HRP 的 pH 值升高到 9.0~9.5 立即加入 5 mg 的 4C13 抗体(溶于 0.01 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液中,总体积为 0.5 mL),室温下避光轻轻电磁搅拌 2 h。然后加入 0.2 mL 新配的 6 g·L⁻¹ 硼氢化钠,混匀后置 4℃下 2 h。将上述溶液装入透析袋中,以 0.15 mol·L⁻¹, pH 7.4 的 PBS 4℃下透析过夜,换透析液 3 次。透析后样品加入 BSA(终浓度为 3 g·L⁻¹),5 000×g 离心 3 min 取上清即为标记后抗体。

1.4 ELISA 法测定酶标单克隆抗体 4C13 的滴度

含有蓖麻毒素 3 mg·L⁻¹ 抗原包被液(50 mmol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液, pH 9.6),每孔 100 μL 包被酶标板 4℃过夜。将酶标抗体 HRP-4C13 以含有 0.1% Tween 20 的 PBS(PBST) 1:500 1:1 000 1:2 000 1:4 000 1:8 000 1:10 000 和 1:50 000 稀释,每孔 100 μL 加入以 PBS 稀释 1% BSA 封闭后的酶标板中,37℃孵温 1 h, TMB 显色,450 nm 测定吸光度值(A_{450nm})。

1.5 双抗体夹心 ELISA 方法确定检测蓖麻毒素的配对抗体

蓖麻毒素 mAb 3D74、5E4 和 5H6 包被量同为 5 mg·L⁻¹,每孔 100 μL,4℃过夜。PBST 洗 3 遍,1% BSA 37℃封闭 1 h, PBST 洗 3 遍后加入浓度分别为

0.2, 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蓖麻毒素, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵温 1 h, PBST 洗 3 遍后加入 HRP-4C13 (1:3 000 PBST) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵温 45 min, PBST 洗 6 遍, TMB 显色, 测定 $A_{450\text{nm}}$ 。比较 mAb 3D74, 5E4 和 5H6 与 HRP-4C13 配对检测蓖麻毒素的 $A_{450\text{nm}}$, 确定最佳配对抗体。

1.6 双抗体夹心 ELISA 检测蓖麻毒素条件优化

mAb 3D74 包被浓度为 0.05, 1, 2.5, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 以 PBST 1:1 000, 1:2 000, 1:3 000, 1:4 000 稀释 HRP-4C13 测定蓖麻毒素 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 进行 ELISA 反应, 参照对不同浓度毒素的检测结果, 确定最佳 3D74 包被浓度和 HRP-4C13 稀释比例。

1.7 双抗体夹心 ELISA 检测染毒样品中蓖麻毒素

以蓖麻毒素 mAb 3D74 和 HRP-4C13 双夹心 ELISA 方法测定染毒样品。染毒样品制备: 称取干燥土壤、面粉、咸菜 (盐渍青菜) 各 1 g, 腐乳汁 1 mL, 加入 5 mL PBST, 混匀离心取上清; 新鲜牛奶, 可乐, 雪碧各 1 mL, 加入 1 mL PBST。将不同浓度的蓖麻毒素 (0.5, 10, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 与等体积所制样品溶液混合, 即为含有蓖麻毒素 (0.2, 5, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的染毒样品, 与 PBST 等体积混合的毒素样品 (0.2, 5, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为标准对照。

1.8 双抗体夹心 ELISA 检测血清样品中的蓖麻毒素

将 PBST、小鼠血清、人血清同等体积蓖麻毒素 (0.5, 10, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 PBST 溶液混合即为含有蓖麻毒素 (0.2, 5, 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 待检样品。实验方法同上。

2 结果

2.1 蛋白 G 亲和层析纯化抗蓖麻毒素单克隆抗体

蛋白 G-Sepharose 4B 能够对蓖麻毒素 mAb 进行有效的纯化。SDS-PAGE 的结果显示, 纯化后的蓖麻毒素 mAb 3D74, 4C13, 5E4 和 5H6 具有较高的蛋白纯度 (图 1)。

2.2 HRP-4C13 的效价测定

HRP-4C13 以 PBST 稀释不同比例, 应用 ELISA 法测定 $A_{450\text{nm}}$, 当蓖麻毒素包被浓度 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HRP-4C13 的效价可达到 1:10 000, 其 $A_{450\text{nm}}$ 为 0.328 ± 0.004 , 明显高于空白对照 (0.056 ± 0.014), HRP-4C13 滴度高, 可以作为酶标记抗体用于蓖麻毒素的双抗体夹心 ELISA (图 2)。

2.3 双抗体夹心 ELISA 方法确定检测蓖麻毒素的配对抗体

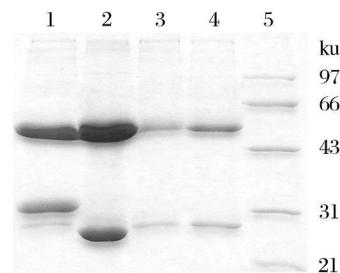


Fig 1 SDS-PAGE of anti-ricin mAbs purified by Protein G Sepharose 4B 12% SDS-PAGE was used. Lane 1: mAb 3D74; 2 mAb 4C13; 3 mAb 5E4; 4 mAb 5H6; 5 protein marker

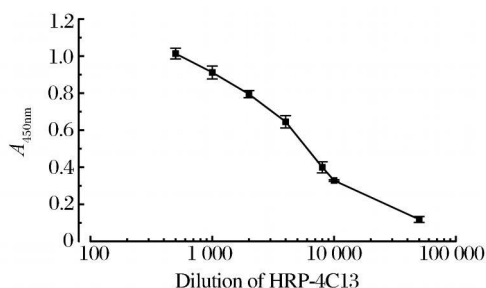


Fig 2 The titer of HRP labeled 4C13 by ELISA The 96 well plate was coated with ricin at the concentration of 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and 100 μL per well. HRP labeled 4C13 was diluted with PBST 1:500, 1:1 000, 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000, 1:10 000 and 1:50 000. The negative control had an absorbance of 0.056 ± 0.014 measured from the wells without ricin coating. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$

确定作用于蓖麻毒素不同抗原表位的 2 个 mAb 是建立双夹心 ELISA 方法的必要条件。将蓖麻毒素 mAb 3D74, 5E4 和 5H6 分别与 HRP-4C13 进行 ELISA, 结果只有 3D74 能与 HRP-4C13 形成双夹心反应, 可检测到 2.5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蓖麻毒素, 5E4, 5H6 和 HRP-4C13 双夹心 ELISA 的反应信号接近于阴性对照 (图 3)。实验室前期免疫印迹实验结果显示, 蓖麻毒素经过 SDS-PAGE 转膜后与 4C13 作用 A 链呈现显色条带, 而与 3D74 作用后无任何显色条带, 说明 4C13 作用于蓖麻毒素 A 链连续性抗原表位, 而 3D74 作用于构象表位, 与 SDS 变性的蓖麻毒素无抗原抗体反应的结果是一致的。将蓖麻毒素以 HRP-4C13 稀释到不同的浓度后直接加样于包被有 3D74 的酶标板, 可以达到同样检测灵敏度, 减少 1 h 的反应时间。

2.4 双抗体夹心 ELISA 检测蓖麻毒素条件优化

为达到最佳抗原抗体反应比例, 设置不同 3D74 包被浓度及不同稀释比例的 HRP-4C13, 检测不同浓度的蓖麻毒素。mAb 3D74 包被浓度为 0.05, 1, 2.5, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, HRP-4C13 稀释比例为 1:1 000,

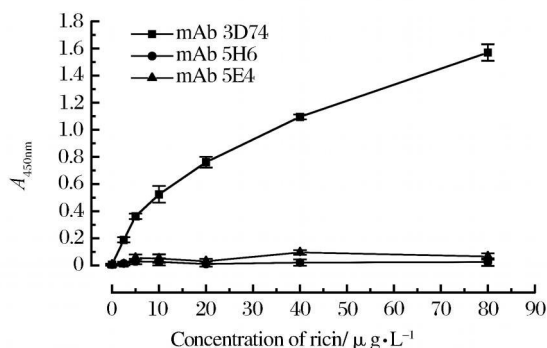


Fig 3 Detection of ricin by sandwich ELISA Anti-ricin mAb 3D74 was coated on 96 well plate at concentration of $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100\text{ }\mu\text{l}$ per well. Ricin was dissolved in PBST at different concentration. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

1: 2 000 1: 3 000 1: 4 000 结果显示, mAb 3D74包被浓度大于 2 或 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 达最高呈色反应; HRP-4C13为 1: 4 000 稀释时, 光吸收明显降低; 1: 2 000和 1: 3 000 稀释时反应结果近似, 略低于 1: 1 000的稀释结果, 考虑到 HRP-4C13为 1: 1 000 稀释时会增加反应本底, 故确定选用 HRP-4C13为 1: 3 000稀释, mAb 3D74包被浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行蓖麻毒素检测, 最佳显色时间因环境温度及检测样品中蓖麻毒素含量可进行适当调整, 室温为 20°C , 蓖麻毒素浓度 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 显色时间约 5 min (图 4)。同样的实验条件下检测浓度为 $5\text{ }10\text{ }40\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 毒素时, 得到相似的实验结果。

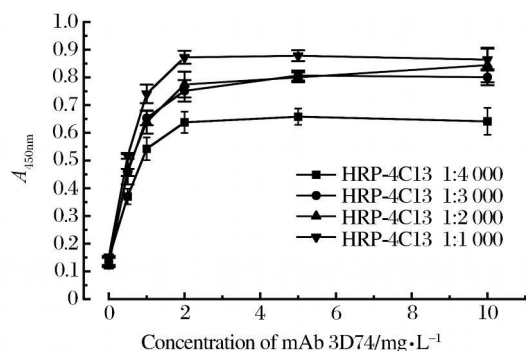


Fig 4 Detection of ricin by sandwich ELISA at different concentrations of monoclonal antibody. Anti-ricin mAb 3D74 was coated on 96 well plate at concentration of $0\text{ }5\text{ }1\text{ }2\text{ }5$ and $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100\text{ }\mu\text{l}$ per well. Ricin was diluted with PBST at the concentration of $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. HRP-4C13 was diluted with PBST. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

2.5 双抗体夹心 ELISA 检测染毒样品中蓖麻毒素

雪碧、可乐和面粉等样品本身对于蓖麻毒素胶体金检测试纸存在不同程度的干扰, 本研究采用建立的双抗体夹心 ELISA 检测含有蓖麻毒素的雪碧、

可乐、牛奶、咸菜、面粉、土壤和腐乳汁等样品, 与无毒样品对照比较, 上述样品的毒素检测灵敏度为 $2.5\sim 5.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 随样品中蓖麻毒素浓度的增大, 反应的 $A_{450\text{nm}}$ 值增加 (图 5), 除咸菜样品外, 以含有同样毒素浓度的 PBST 为标准, 多数样品检测回收率可达 80% 以上, 因此, 同时进行含蓖麻毒素的标准对照, 可以对样品中的毒素含量进行初步定量分析。

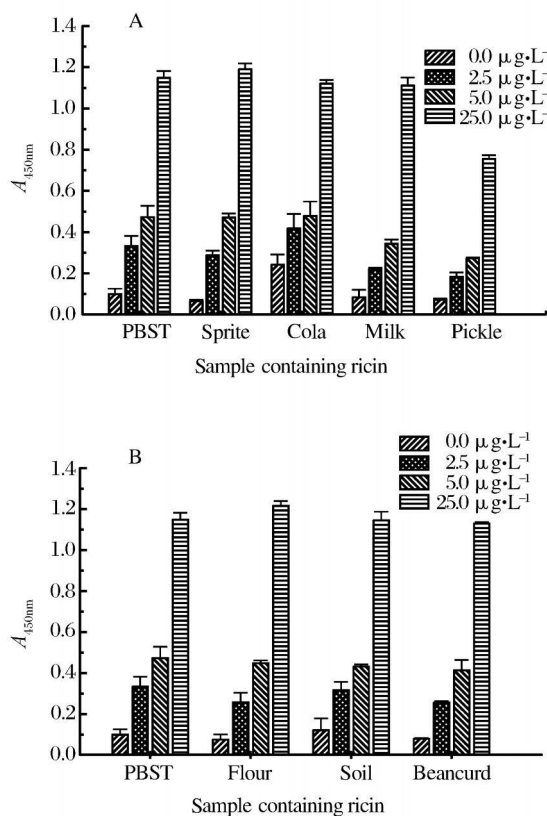


Fig 5 Sandwich ELISA for the detection of ricin containing samples Four concentrations of ricin ($0\text{ }2.5\text{ }5\text{ }25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in each kind of sample were measured. The ricin detection limit could be as low as $2.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBST and $2.5\text{ }5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the solution of soil, flour, milk, pickle, Sprite, Cola and preserved beancurd juice. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

2.6 双抗体夹心 ELISA 检测血清样品中的蓖麻毒素

检测血清样品中的蓖麻毒素, 是对可疑中毒人员进行诊断的最直接的方法, 可以为进一步治疗措施提供实验依据。本研究尝试使用双抗体夹心 ELISA 分析人和小鼠血清中的蓖麻毒素, 与无毒空白样品比较, 此方法对于血清样品中蓖麻毒素检测灵敏度可达 $2.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 此时 $A_{450\text{nm}}$ 值高于对照 2 倍以上。但与含有同样浓度毒素的 PBST 相比, 血清样品, 尤其是人血清样品的 $A_{450\text{nm}}$ 值明显下降 (图 6),

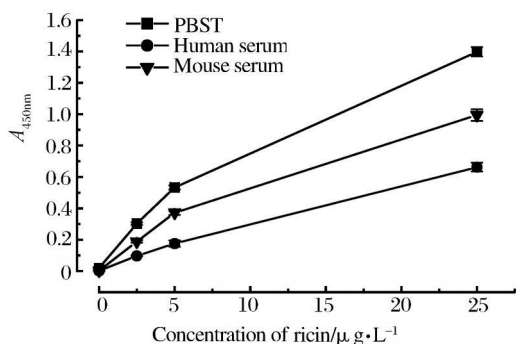


Fig 6 Sandwich ELISA of ricin in human and mouse serum.

The detection limit of ricin in human or mouse serum was $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The absorbance of ELISA for the ricin in mouse serum or human serum sample was lower than that in PBST at the same concentration of ricin. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$.

下降的原因可能来自毒素与血清成分的结合影响了抗原抗体反应强度, 或者血清中的蛋白酶等成分对于毒素的蛋白降解作用, 其机制还有待于进一步的实验证实。

3 讨论

随着生物毒素的开发利用, 许多国家都具有发展毒素战剂的能力, 毒素武器化已经趋于成熟, 蓖麻毒素就是其典型的代表, 被列入禁止化武公约的一级控制清单之中。蓖麻毒素由于毒性强, 制备工艺简单, 理化性质相对稳定, 能溶于水, 如为恐怖分子利用进行恐怖袭击, 将造成严重的社会危害^[13]。

本研究建立的双抗体夹心 ELISA 方法对于蓖麻毒素具有较高的检测灵敏度和特异性, 检测样品包括食品 (面粉), 高糖饮料 (雪碧、可乐), 高盐的咸菜汁, 蛋白含量高的牛奶, 环境样品 (土壤) 及成分复杂的血清样品, 检测灵敏度达到 $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此方法作为毒素检测试纸补充, 特别适用于检测试纸鉴定阳性样品的再次认证和对检测试纸测定存在明显干扰样品的毒素分析, 是一种简便、有效的蓖麻毒素检测方法。

应用此方法进行小鼠和人血清样品中蓖麻毒素的检测, 结果显示与含有相同浓度蓖麻毒素的 PBST

比较, 人血清和小鼠血清样品得出的阳性信号明显减弱, 虽然可以达到 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 灵敏度, 考虑到毒素在动物体内的分布、吸收和代谢等因素, 还需要建立更为灵敏的检测方法用于组织样品中蓖麻毒素的分析。

致谢: 感谢军事医学科学院基础医学研究所分子免疫实验室为本研究提供抗蓖麻毒素抗体腹水。

参 考 文 献

- [1] Gibbs G, Ferreras M, Arias FJ *et al* Description, distribution activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2004, 4(5): 461–467.
- [2] Stipe F. Ribosome-inactivating proteins[J]. *Toxicol*, 2004, 44(4): 371–383.
- [3] Bradberry SM, Dickens KJ, Rice P, *et al* Ricin poisoning[J]. *Toxicol Rev*, 2003, 22(1): 65–70.
- [4] Lord MJ, Jolliffe NA, Marsden CJ *et al* Ricin: mechanisms of cytotoxicity[J]. *Toxicol Rev*, 2003, 22(1): 53–64.
- [5] Franz DR, Jaax NK. Ricin toxin[A]. In Zajtcuk R, Bellamy RF, eds. *Textbook of Military Medicine*[M]. Part 1 Warfare, Weaponry, and the Casualty. Washington DC: Office of the Surgeon General a TMM Publication, 1997.
- [6] Johnson RC, Lemire SW, Woolfitt AR, *et al* Quantification of ricin in rat and human urine: a biomarker for ricin exposure[J]. *J Anal Toxicol*, 2005, 29(3): 149–155.
- [7] 王俊虹, 康琳, 高 珊, 等. 蓖麻毒素及检测技术[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 376–377.
- [8] Peruski AH, Peruski LF Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(4): 506–513.
- [9] Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, *et al* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin[J]. *Toxicol*, 2002, 40(3): 255–258.
- [10] Guo J, Shen B, Sun Y, *et al* A novel neutralizing monoclonal antibody against both ricin toxin A and ricin toxin B, and application of a rapid sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Hybridoma*, 2006, 25(4): 225–229.
- [11] 林清华, 主编. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1999, 124–128.
- [12] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000, 52–58.
- [13] Bradberys. Ricin and abrin[J]. *Medicine*, 2007, 35(10): 576–577.

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎登陆我刊网站