

19-去甲睾酮单克隆抗体的筛选及 icELISA 方法的建立

姜金庆^{①②}, 张海棠^①, 范国英^①, 马金友^①, 王自良^{①*}, 王建华^②

① 河南科技学院动物科学学院, 新乡 453003;

② 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100

* 联系人, E-mail: wangzl_2008@yahoo.com.cn

2010-12-13 收稿, 2011-04-19 接受

国家科技支撑计划重大项目(2006BAK02A21/1)和河南省高校科技创新人才支持计划(2010HASTIT026)资助

摘要 采用细胞融合技术筛选抗 19-去甲睾酮(nortestosterone, NT)单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)杂交瘤细胞株, 体内诱发性腹水法制备 NT mAb, 建立异源性间接竞争 ELISA (indirect competitive ELISA, icELISA)标准曲线, 并对其特异性、理化因素的影响和基质效应性进行探讨. 结果表明, 筛选的 5 株杂交瘤细胞分泌的单抗腹水效价为 $0.64 \times 10^5 \sim 2.56 \times 10^5$, 半数抑制浓度 IC_{50} 为 $0.55 \sim 1.0$ ng/mL, 抗体为 IgG₁ 亚型, 具 k 轻链, 亲和常数 K_a 为 $2.6 \times 10^9 \sim 4.7 \times 10^9$ L/mol. 建立的 icELISA 标准曲线在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)中的线性检测范围为 $0.004 \sim 85.8$ ng/mL, IC_{50} 值为 0.55 ng/mL, 检测限(limit of detection, LOD)为 0.002 ng/mL; 抗体与 17 α -去甲睾酮的交叉反应率(cross-reactivity, CR)为 62%, 与其他化合物无 CR. 标准品稀释液中甲醇的最佳含量为 10%, 牛尿 1:20 倍稀释可消除基质干扰, ELISA 方法和液质联用检测(LC-MS/MS)的相关性良好($R^2=0.9871$).

关键词

19-去甲睾酮
杂交瘤细胞株
单克隆抗体
间接竞争 ELISA
牛尿

19-去甲睾酮(nortestosterone, NT, 17 β -hydroxyestr-4-en-3-one), 简称诺龙, 是睾酮甾环结构上脱去第 19 位碳原子而形成的内源性和外源性蛋白同化激素^[1], 具有很强的促蛋白质合成能力, 能参与生长发育的生理调节, 促进骨骼和肌肉的生长, 减少脂肪贮积. 因此, 20 世纪 50 年代以后, 许多国家和地区将 19-去甲睾酮用作畜禽生长促进剂, 以改善生产性能, 提高饲料报酬^[2~4]. 临床应用时, 将酯化后的药物制成苯甲醇或植物油悬液, 进行肌肉注射或耳根部包埋. 药物可以逐步释放 50 d 左右, 以维持家畜体内恒定而稍高的激素水平^[5]. 运动员服用后, 能增强肌肉力量, 结合适度的锻炼和饮食, 可提高比赛成绩^[4,6].

研究表明, NT 及其代谢物残留可影响人的肝脏功能, 损害心血管系统, 还可造成生殖器官受损、肾上腺萎缩、情绪失控及内分泌失调等毒副作用^[7~10]. 因此, 从 1986 年开始, 欧盟就禁止以促进生长为目的在食源性动物中使用天然或人工合成性激素, 以

保护消费者避免因激素残留物或代谢物而引起发育问题、神经毒性和遗传障碍^[11]. 农业部 2002 年 4 月发布的第 193 号公告《食品动物禁用的兽药及其他化合物清单》也明确规定性激素类原料药及其单方、复方制剂不得在饲养过程中使用. 然而, 食源性动物中违禁使用 NT 的案例在欧洲有大量报道^[2], 中国养殖场也存在激素的非法使用问题. 这就要求对食源性动物生产进行严格的激素滥用监测, 以保护消费者的身心健康.

激素残留传统的检测方法有气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometric, GC-MS)^[6,12~14]、液相色谱质谱联用法^[15~17]以及其他定量检测方法. 这些方法需要专业的技术人员、繁琐的样品前处理过程和昂贵的仪器设备, 不适合大批量市场检测和现场监控. 而免疫学检测技术灵敏度高、特异性强、操作简单、价格低廉, 能够实现对生物液体的小体积、大通量检测, 逐渐成为有毒有害残留物检测的替代方法

英文版见: Jiang J Q, Zhang H T, Fan G Y, et al. Preparation of monoclonal antibody based indirect competitive ELISA for detecting 19-nortestosterone residue. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4604-y

之一. 本研究用细胞融合技术筛选抗 19-去甲睾酮单克隆杂交瘤细胞株, 制备高亲和力单克隆抗体, 建立间接竞争 ELISA 检测方法. 该研究可以优化液质联用和气质联用等理化方法的样品前处理过程, 同时为免疫检测试剂盒和试纸条的研制提供基础.

1 材料和方法

(i) 材料和试剂. 19-去甲睾酮(NT)、17 α -去甲睾酮(a-NT)、雌二醇、群勃龙、甲基睾酮和氯睾酮购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; NT-17-BSA 免疫原和 NT-3-OVA 检测抗原由本实验室自备; 鼠单克隆抗体鉴定试剂盒、碳化二亚胺(EDC)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)为 Pierce 产品; 羊抗鼠酶标二抗(GaMlgG-HRP)购自华美生物工程公司; 牛血清白蛋白(BSA, MW 为 67000)、鸡卵清蛋白(OVA, MW 为 45000)购自 Sigma 公司; 小鼠骨髓瘤 NS0 细胞株由英国国家动物健康研究院惠赠; N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)为日本株式会社产品; 透析袋(8000~14000 D)为 Solarbio 产品; 96 孔聚乙烯酶标板、96 孔和 24 孔细胞培养板、100 mL 细胞瓶购自 Costar 公司; RPMI-1640, HAT 和 HT 培养基购自 Gibco 公司; PEG-1500 (50%)为 Roche 产品; 胎牛血清(FBS)购自杭州四季清生物工程公司; 琥珀酸酐、四甲基联苯胺(TMB)、非那西丁、过氧化脲为 Sigma 产品; 其他所有试剂均为分析纯. 6~8 周龄 Balb/C 小鼠购自北京医科大学动物实验中心, 本实验室动物房繁育.

(ii) 缓冲液. 碳酸盐缓冲液(carbonate buffered saline, CBS, pH 9.6)含有 Na₂CO₃ (15 mmol/L)和 NaHCO₃ (35 mmol/L); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)含有 NaCl (137 mmol/L), Na₂HPO₄·12H₂O (10 mmol/L), KCl (2.68 mmol/L)和 KH₂PO₄ (1.47 mmol/L); 洗液(PBST)为含有 0.05%吐温-20 的 PBS; 封闭液、稀释液为含有 5%猪阴性血清的 PBST; 酶底物为 TMB 的磷酸-柠檬酸缓冲液(A, B); 终止液为 2 mol/L H₂SO₄.

(iii) 仪器与设备. MULTISKAN MK3 酶标仪和 GS15R 高速冷冻离心机购自 Thermo 公司(美国); Galaxy S+型 CO₂ 细胞培养箱购自 RS-Biotech 公司(英国); TS100-F 倒置生物显微镜购自 Nikon 公司(日本); 925REL#10 超低温冰箱购自 Thermo Forma 公司(美国); eLINE 微量移液器购自百得公司(芬兰); SZ-97 自动三重蒸馏水器购自上海雅荣生化仪器有限公司;

PHS-3TC 精密酸度计购自上海天达仪器有限公司.

(iv) ELISA 检测程序. 间接 ELISA: 用 CBS 稀释的 NT-3-OVA 包被原(2 μ g/mL)包板, 每孔 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜. PBST 洗板 3 次后用 250 μ L/孔的封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h. 再次洗板后加入用 PBS 倍比稀释的抗血清, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 min, PBST 洗板 3 次. 然后加入经稀释液 1:1000 倍稀释的 GaMlgG-HRP, 每孔 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温育 25 min, PBST 洗板 3 次. 加入 60 μ L/孔新鲜配制的酶底物(A, B 液), 室温下显色 15 min, 然后加入 100 μ L/孔 2 mol/L H₂SO₄ 终止酶促反应. 反应设阴性对照(negative control, NC)和 PBS 空白对照(blank control, BC), 每次检测 3 个重复. 酶标仪测定每孔 A₄₅₀ 值, 以阳性/阴性(P/N)>2.1, 且 P-N>0.2 为标准, 计算抗体效价.

间接竞争 ELISA (indirect competitive ELISA, icELISA): 参照间接 ELISA 程序包板和封闭, 方阵滴定法测定最佳浓度. 酶标板包被 100 μ L/孔检测抗原后, 加入 50 μ L/孔不同浓度的 NT 标准品或其他激素标准品溶液, 同时加入等体积适当稀释倍数的单克隆抗体(NT mAb)或腹水上清, 37 $^{\circ}$ C 温育 15 min. 检测设阳性对照(B₀), 其他操作同间接 ELISA. 抑制率以 B/B₀ 表示, 其中 B 代表每孔吸光度值, B₀ 代表阳性对照孔吸光度值, 四参数曲线拟合绘制标准曲线.

(v) 动物免疫. 用 NT-17-BSA 免疫 8~10 周龄雌性 Balb/C 小鼠 5 只, 剂量为 60 μ g/只, 体积为 0.2 mL, 颈背部皮下多点注射. 首先用 PBS 稀释的免疫原与等体积 FCA 完全乳化, 以后每隔 3 周加强免疫 1 次, 换用 FIA 乳化, 共强化免疫 3 次. 最后 1 次免疫后 3 周断尾采血分离血清, 用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 筛选效价高、抑制效果好的小鼠作为融合备用鼠. 融合前 3~4 d 用不加佐剂的免疫原对小鼠进行免疫, 尾静脉和腹腔各注射 50 μ g 免疫原, 体积均为 100 μ L.

(vi) 细胞融合. 融合前 4~5 d 用含有 8-氮鸟嘌呤的完全培养基(含 15% FBS 的 RPMI-1640)传代培养 NS0 细胞; 前 1 d 用 HAT 培养滋养细胞; 融合时眶下窦采血, 脱颈致死小鼠. 无菌取脾脏制备脾细胞, 在 PEG-1500 作用下与 NS0 细胞融合(细胞数量比约为 10:1), 将融合后的细胞悬液加入已铺有滋养细胞的 96 孔细胞板中, HAT 培养^[18,19].

(vii) 杂交瘤细胞株的筛选. 融合后 10~14 d, 用间接 ELISA 和 icELISA 筛选强阳性、抑制率高、生

长状态好的杂交瘤细胞株,用有限稀释法进行3次亚克隆.将筛选的单克隆源细胞株由24孔细胞板转移到50或100 mL细胞瓶中扩大培养,并将HAT培养基逐渐过渡为HT培养基和完全培养基.培养液离心后,细胞上清于-20℃冻存备用;单克隆细胞株用含10%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的培养基在液氮中保存,而后冻融3次进行细胞稳定性评估.

(viii) 单克隆抗体的生产. 筛选的杂交瘤细胞浓度达到约 $10^7/\text{mL}$ 时,向10 d前经液体石蜡处理过的经产母鼠腹腔内注射单克隆细胞 $10^8/\text{只}$.10~12 d后抽取腹水,饱和硫酸胺法纯化NT mAb^[20].

(ix) 单克隆抗体的鉴定. 分光光度计法测定蛋白质含量^[21],计算公式为蛋白质浓度(mg/mL)= $1.45A_{280\text{ nm}}-1.74A_{260\text{ nm}}$,其中A为光密度值;Batty饱和法测定亲和常数 K_a ^[22];单抗试剂盒进行亚型鉴定.

(x) ELISA 标准曲线的建立和优化. 方阵滴定法筛选检测抗原浓度和单克隆抗体的最佳稀释倍数; IC_{50} 值计算灵敏度,代表标准品对抗原抗体结合50%时的抑制浓度;最低检测限(limit of detection, LOD)以15%抑制率表示^[23];标准曲线的线性范围以 IC_{20} – IC_{80} 值计算;交叉反应率(cross-reactivity, CR)测定抗体特异性^[24],计算公式为((NT的 IC_{50} 值)/(功能类似化合物的 IC_{50} 值)) $\times 100$,CR越低,抗体特异性越强.将NT标准品用含不同浓度甲醇的PBS进行稀释(5%, 10%, 20%, 30%和40%),以 A_{max} 和 IC_{50} 值确定PBS稀释液中甲醇的最佳含量.

(xi) 基质效应性. 操作程序参考文献[25].将10 mL牛尿于4℃,3000 r/min离心10 min,上清液转移至带刻度烧杯中.为评估基质干扰,将上清液用PBS稀释2, 5, 10和20倍后进行ELISA检测.以吸光度值为纵坐标、NT浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算B和 B_0 值,进行相关分析.

(xii) LC-MS/MS 检测. 参照Strahm等人^[26]的方法,并加以改进.取10 mL尿样于3500 r/min离心5 min,上清液加入0.2 mol/L醋酸缓冲液(pH 5.2) 10 mL混匀,然后加入50 μL β -葡萄糖醛酸苷酶(Sigma-Aldrich, 美国)酶解.混合物用10 mL甲醇萃取,过柱净化.将SPE C_{18} 柱依次用5 mL甲醇和5 mL去离子水活化,萃取液全部上样后,用10 mL正己烷:乙醚(7:3, 体积比)洗脱目标化合物并收集.洗脱液离心后,有机相在氮气流下吹干,残留物再次定容于甲醇中,上样分析.

检测条件:采用SURVEYOR液相色谱仪(Thermo公司, 美国),配备ODS-HYPERSIL色谱柱(3 μm , 2.1 $\times$ 150 mm)和PDA检测器(Thermo-Finnigan, 美国).流动相为1%甲酸的水/乙腈/甲醇溶液(60:20:20, 体积比, pH 2.5),流速为0.2 mL/min,柱温为30℃,进样量为10 μL ,紫外检测波长为242 nm.质谱条件:ESI⁺电喷雾离子源(LCQ Deca XP MAX, Finnigan公司, 美国),相对裂解能量28%,二级碎片离子进行定性、定量分析.

2 结果

2.1 细胞融合备用鼠的选择

如图1所示,4只小鼠获得了较好的免疫效果,其中4号小鼠的抑制效果最好($IC_{50}=17.5\text{ ng/mL}$),因此选择4号小鼠作为细胞融合备用鼠.

2.2 NT mAb的制备及性能鉴定

细胞融合10 d后观察融合效果,融合率为85%;间接ELISA和竞争ELISA检测细胞上清,阳性率为18%.有限稀释法3次亚克隆后,筛选出5株抗体分泌稳定的杂交瘤细胞株,分别命名为NT-1, NT-2, NT-3, NT-4和NT-5.细胞株单抗亚类均为IgG₁型,具k轻链;腹水纯化后的蛋白质含量为5.6~8.4 mg/mL.方阵滴定法检测抗体效价和灵敏度,结果见表1. NT-1和NT-2腹水的灵敏度最高,分别为0.55和0.58 ng/mL;与NT pAb相比,灵敏度提高了近30倍.因此,选择灵敏度最好的NT-1单克隆抗体建立ELISA标准曲线,并进行抗体特异性鉴定.

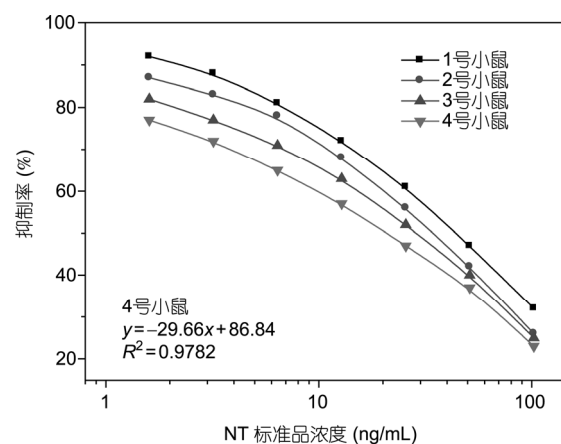


图1 备用小鼠抗血清间接竞争ELISA曲线

表 1 NT 单克隆抗体杂交瘤细胞株的效价和半数抑制浓度(IC₅₀)

单抗细胞株	上清效价	腹水效价	腹水 IC ₅₀ 值(ng/mL)
NT-1	5.12×10 ²	2.56×10 ⁵	0.55
NT-2	5.12×10 ²	2.56×10 ⁵	0.58
NT-3	2.56×10 ²	1.28×10 ⁵	0.8
NT-4	1.28×10 ²	1.28×10 ⁵	0.93
NT-5	1.28×10 ²	0.64×10 ⁵	1.0

2.3 杂交瘤稳定性

通过 3 次冻融实验, 观察细胞株稳定性, IC₅₀ 值变化情况见图 2. 从结果可以看出, NT-1 和 NT-2 杂交瘤细胞株的稳定性最好.

2.4 亲和常数 K_a

将杂交瘤细胞株分泌的 mAbs 和 NT-3-OVA 检测抗原倍比稀释, 间接 ELISA 程序测定亲和常数, 结果见图 3. NT-1, NT-2, NT-3, NT-4 和 NT-5 mAb 的亲

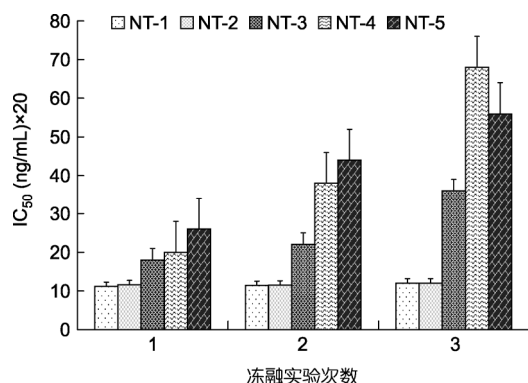


图 2 三次冻融后不同杂交瘤细胞株单克隆抗体的 IC₅₀ 值

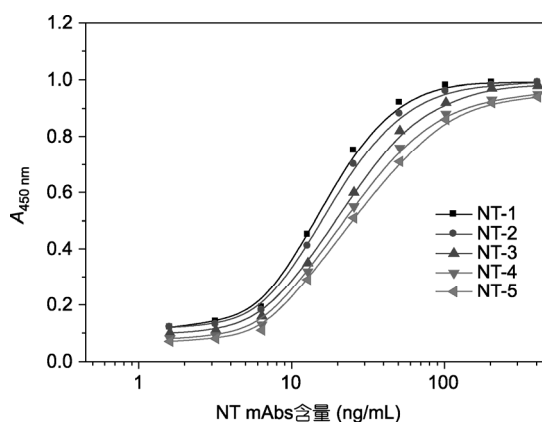


图 3 NT 单克隆抗体的亲和常数 K_a

和常数分别为 4.7×10⁹, 4.2×10⁹, 3.9×10⁹, 2.9×10⁹ 和 2.6×10⁹ L/mol.

2.5 异源性 icELISA 标准曲线的建立

方阵滴定法测定, 检测抗原最佳浓度为 2 μg/mL, 单抗稀释倍数为 1:50000, 异源性 icELISA 标准曲线见图 4. 该曲线定量范围(IC₂₀-IC₈₀)为 0.004~85.8 ng/mL, IC₅₀ 值为 0.55 ng/mL. 最低检测限(LOD)测定值为 0.002 ng/mL.

2.6 特异性

抗体特异性对评价检测结果有重要意义. 因此, 在 icELISA 检测过程中, 用 NT 结构类似物代替 NT 标准品溶液, 测定不同化合物的 IC₅₀ 值, 计算交叉反应率(图 5). 在所有测定的化合物中, NT 主要代谢物 α-NT 的 CR 值为 62%; 而其他化合物的 CR 值<0.01%, 可以忽略不计.

2.7 稀释液中甲醇含量的影响

NT 难溶于水, 需甲醇等溶剂助溶. 稀释液中不同甲醇含量的标准曲线如图 6 所示. 通过比较 A_{max} (NT 标准品 0 ng 时的最大吸光度)和 IC₅₀ 值, 稀释液中甲醇的最佳含量确定为 10%.

2.8 基质效应性

尿液中不同化合物能抑制免疫测定过程中抗原抗体的结合反应; 基质中饲料残留、较高的离子强度和 pH 也能降低灵敏度和 A_{max} 值. 因此, 仅用离心法无法消除基质干扰, 获得的标准曲线吸光度下降, 本

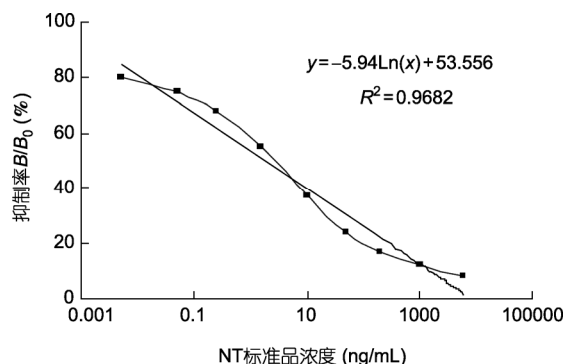


图 4 优化的异源性间接竞争 ELISA 标准曲线
CBS 稀释包被抗原 NT-3-OVA 浓度为 2 μg/mL; PBS 稀释 NT-1 杂交瘤细胞株腹水为 1:50000; NT 标准品稀释液为含 10%甲醇的 PBS

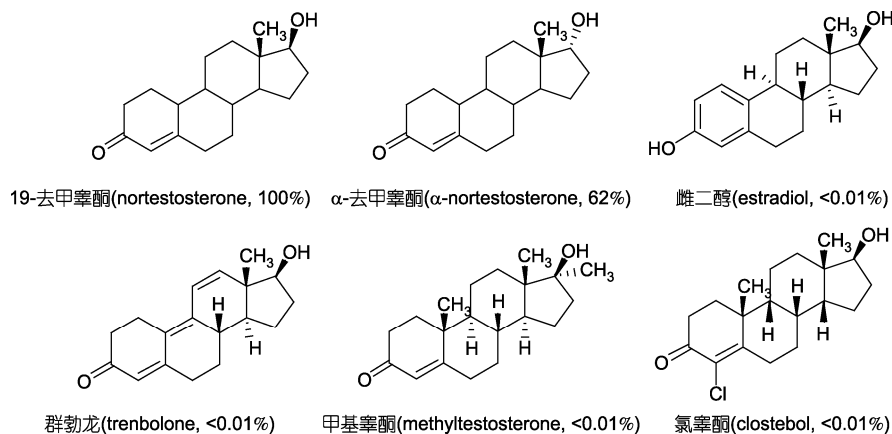


图5 NT单克隆抗体与结构类似化合物的交叉反应率

底干扰大. NT标准品在PBS和不同稀释度尿液中的ELISA曲线见图7. 可以看出, 当尿液1:20倍稀释时, 抑制曲线与PBS基本相同.

2.9 ELISA与LC-MS/MS相关性分析

比较ELISA和LC-MS/MS的检测结果, 验证

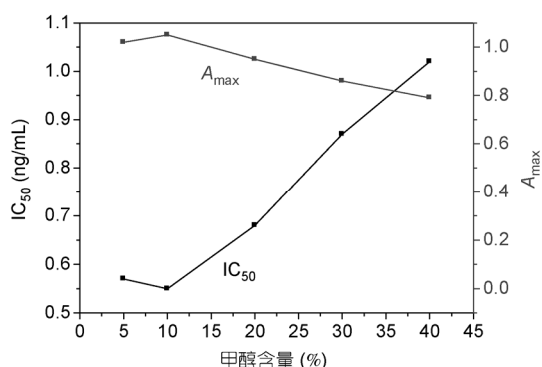


图6 PBS中甲醇含量对ELISA检测性能的影响

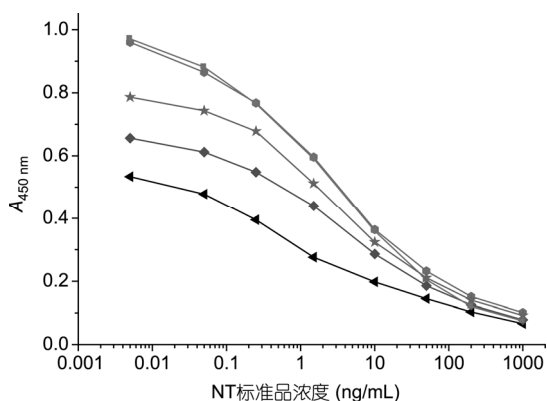


图7 尿液不同稀释倍数的ELISA标准曲线

■, PBS缓冲液; ▲, 2倍稀释; ◆, 5倍稀释; ★, 10倍稀释; ●, 20倍稀释

icELISA方法的有效性, 结果见图8. 当尿液中添加不同浓度标准品, 2种方法检测结果相关性良好($R^2 = 0.9871$), ELISA方法没有出现假阳性案例. 从当地屠宰场提取15份尿样用于ELISA检测, NT残留量为0.06~0.35 $\mu\text{g/kg}$ (0.06~0.35 ng/mL); LC-MS/MS确认为0.05~0.32 $\mu\text{g/kg}$ (0.05~0.32 ng/mL), 这说明所建立的免疫学方法可用于食源性动物NT残留量的筛选.

3 讨论

免疫分析是以抗原抗体的特异性识别和可逆性反应为基础的痕量分析方法, 已在残留物检测中得到广泛应用. 而抗体质量决定着免疫学检测技术的成败, 其特性主要体现在结合容量、灵敏度、亲和力和特异性等几个方面. 多克隆抗体(polyclonal antibody, pAb)通常含有干扰杂质及不同抗原决定簇诱导

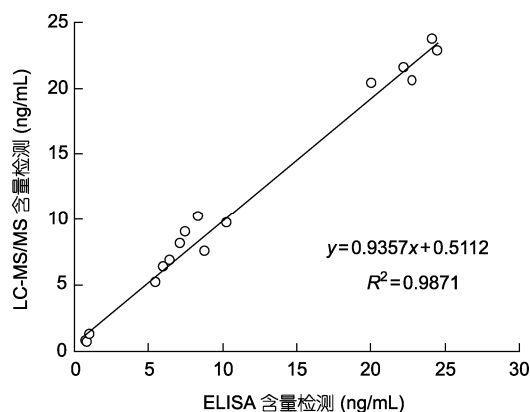


图8 ELISA和LC-MS/MS检测牛尿中不同NT添加浓度的相关系数

的免疫球蛋白,因此试剂盒的检测性能受到质疑. 1975年, Köhler 和 Milstein^[18]建立的杂交瘤细胞融合技术使生产匀质的、无限量的单克隆抗体(mAb)成为可能. 本实验利用细胞融合技术筛选出5株杂交瘤细胞,其中 NT-1 和 NT-2 具有较高的抗体效价($1:2.56 \times 10^5$)和较好的灵敏度(分别为 0.55 和 0.58 ng/mL). 以 NT-1 单克隆抗体为基础,本文建立了异源性 icELISA 分析方法,并在牛尿基质中进行 NT 残留物含量检测.

亲和常数 K_a 对抗体的质量有重要影响,决定着抗体与半抗原或抗原决定簇之间的偶合能力,是抗体稳定性的重要指标. 测定亲和常数的常用方法包括平衡透析法、Scatchard Plot 法、Batty 饱和法、竞争结合法、沉淀法和其他方法. 其中 Batty 饱和法简单、快速、结果可靠,得到了广泛应用. 测定时,以抗体浓度对数值为横坐标,以吸光度(A)为纵坐标,绘制 S 形标准曲线,比较 A_{450} (半量饱和吸光度)值,判断抗体对位识别抗原表位的相对数量. James^[27]提出, K_a

在 $10^7 \sim 10^{12}$ L/mol 之间为高亲和力抗体. 本试验所制备的 NT mAbs 均为高亲和力抗体.

特异性抗体的制备是建立 NT 半抗原免疫学检测方法的关键. 本研究利用 NT 分子上的 2 个偶联位点,采用混合酸酐法合成 NT-3-OVA 检测抗原,同时采用优化的 EDC 法合成 NT-17-BSA 免疫原,制备抗 NT mAb,建立异源性 icELISA 标准曲线. 异源性检测克服了非特异性结合所固有的干扰,提高了检测灵敏度,减少了交叉反应^[28,29]. 半抗原、抗原和抗体之间的相互作用是由分子几何形状所形成的空间互补结构,以及氢键、疏水性、静电作用等形成的低能势共同决定的,因此半抗原的分子构象对抗体特异性有决定性影响. 在交叉反应化合物当中, α -NT 和 NT 有相似的分子和空间结构,因此交叉反应率较高(62%);而其他待测化合物因环戊烷多氢菲环上含有烷基、C=C 双键或氯原子,导致显著的空间位阻效应,交叉反应可以忽略不计.

参考文献

- 1 Sterk S, Herbold H, Blokland M, et al. Nortestosterone: Endogenous in urine of goats, sheep and mares? *Analyst*, 1998, 123: 2633–2636
- 2 Sauer M J, Samuels T P, Howells L G, et al. Residues and metabolism of 19-nortestosterone laurate in steers. *Analyst*, 1998, 123: 2653–2660
- 3 Conneely G, Aherne M, Lu H, et al. Development of an immunosensor for the detection of testosterone in bovine urine. *Anal Chim Acta*, 2007, 583: 153–160
- 4 Roda A, Manetta A C, Portanti O, et al. A rapid and sensitive 384-well microtitre format chemiluminescent enzyme immunoassay for 19-nortestosterone. *Luminescence*, 2003, 18: 72–78
- 5 Conneely G, Aherne M, Lu H, et al. Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine. *Sens Actuators*, 2007, 121: 103–112
- 6 Yamada M, Aramaki S, Kurosawa M, et al. Simultaneous doping analysis of main urinary metabolites of anabolic steroids in horse by ion-trap gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Sci*, 2008, 24: 1199–1204
- 7 Bahrke M S, Yesalis C E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 614–620
- 8 Baume N, Avois L, Schweizer C, et al. Nandrolone excretion in trained athletes: Interindividual variability in metabolism. *Clin Chem*, 2004, 50: 355–364
- 9 Akhter J, Hyder S, Ahmed M. Cerebrovascular accident associated with anabolic steroid use in a young man. *Neurology*, 1994, 44: 2405–2406
- 10 Brännvall K, Bogdanovic N, Korhonen L, et al. 19-Nortestosterone influences neural stem cell proliferation and neurogenesis in the rat brain. *Eur J Neurosci*, 2005, 21: 871–878
- 11 EC (1996) Council Directive (96/22/EC) of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stock farming of certain substances, having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists, and repealing Directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC. *Off J Eur Commun*, L125, 3–9
- 12 Bagnati R, Fanelli R. Determination of 19-nortestosterone, testosterone and trenbolone by gas chromatography-negative-ion mass spectrometry after formation of the pentafluorobenzyl carboxymethoxime-trimethylsilyl derivatives. *J Chromatogr*, 1991, 547: 325–334
- 13 Seo J, Kim H Y, Chung B C, et al. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2005, 1067: 303–309

- 14 Dehennin L, Bonnaire Y, Plou P. Urinary excretion of 19-norandrosterone of endogenous origin in man: Quantitative analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 1999, 721: 301–307
- 15 Kim J Y, Choi M H, Kim S J, et al. Measurement of 19-nortestosterone and its esters in equine plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000, 14: 1835–1840
- 16 Pozo O J, Van Eenoo P, Deventer K, et al. Development and validation of a qualitative screening method for the detection of exogenous anabolic steroids in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389: 1209–1224
- 17 Grace P B, Drake E C, Teale P, et al. Quantification of 19-nortestosterone sulphate and boldenone sulphate in urine from male horses using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 2999–3007
- 18 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495–497
- 19 Chen Y, Wang Z, Wang Z, et al. Rapid enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for kanamycin and tobramycin in swine tissues. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 2944–2952
- 20 Zhao S Q, Sun Y M, Zhang C Y, et al. Studies on purification of methamidophos monoclonal antibodies and comparative immunoactivity of purified antibodies. *Biomed Environ Sci*, 2003, 16: 119–125
- 21 Wang Z, Zhu Y, Ding S, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds. *Anal Chem*, 2007, 79: 4471–4483
- 22 Wang Y C, Guo Z Q, Li Y Z, et al. Production and characterization of anti-estrone monoclonal antibody. *Biomed Environ Sci*, 2002, 15: 103–112
- 23 Wang L, Zhang Y, Gao X, et al. Determination of chloramphenicol residues in milk by enzyme-linked immunosorbent assay: Improvement by biotin-streptavidin-amplified system. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 3265–3270
- 24 Watanabe E, Eun H, Baba K, et al. Synthesis of haptens for development of antibodies to alkylphenols and evaluation and optimization of a selected antibody for ELISA development. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 7395–7403
- 25 Zhang Y, He F, Wan Y, et al. Generation of anti-trenbolone monoclonal antibody and establishment of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of trenbolone in animal tissues, feed and urine. *Talanta*, 2011, 83: 732–737
- 26 Strahm E, Saudan C, Sottas P E, et al. Direct detection and quantification of 19-norandrosterone sulfate in human urine by liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 491–496
- 27 James W G. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. New York: Academic Press, 1983. 142–147
- 28 Beier R C, Ripley L H, Young C R, et al. Production, characterization, and cross-reactivity studies of monoclonal antibodies against the coccidiostat nicarbazin. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 4542–4552
- 29 Liang Y, Liu X J, Liu Y, et al. Synthesis of three haptens for the class-specific immunoassay of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity. *Anal Chim Acta*, 2008, 615: 174–183