

虾仁中酸性红 73 间接 ELISA 检测方法的建立

常向彩^{1,2}, 韦国陆^{1,*}, 马 明¹, 张声俊³, 施渺筱¹, 杨晓农^{2,*}

(1.安顺学院农学院, 贵州安顺 561000; 2.西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041;
3.安顺学院资源与环境工程学院, 贵州安顺 561000)

摘 要:本文采用活性酯法和 N,N-羰基二咪唑法分别合成了酸性红 73 的人工抗原, 方阵滴定实验表明活性酯法所得免抗酸性红 73 的 IgG 更适合用于后继实验, 以此为基础建立了一种虾仁中酸性红 73 的间接 ELISA 检测方法并对反应条件进行了优化。优化后, 该方法的半数抑制浓度(IC_{50})为 45.39 $\mu\text{g/L}$, 检测限(LOD)为 5.64 $\mu\text{g/L}$ 。交叉反应实验结果表明除苏丹红 3 号(0.15%)外与番红花红、苯酚红、刚果红、碱性品红和胭脂红等其他竞争物无交叉反应。在虾仁中的空白添加回收率范围为 71.3%~84.4%, 变异系数(RSD) < 9.55%。此法可用于虾仁中酸性红 73 的残留检测, 并为进一步制备单克隆抗体和研制快速检测试剂盒奠定了基础。

关键词: 虾仁, 酸性红 73, 活性酯法, N,N-羰基二咪唑法, ELISA

Development of an indirect ELISA for Acid Red 73 in Shrimps

CHANG Xiang-cai^{1,2}, WEI Guo-lu^{1,*}, MA Ming¹, ZHANG Sheng-jun³, SHI Miao-xiao¹, YANG Xiao-nong^{2,*}

(1.College of Agriculture, Anshun University, Anshun 561000, China;

2.College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China;

3.College of Resource & Environment, Anshun University, Anshun 561000, China)

Abstract: Acid red 73 (AR73) was coupled to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) by the use of N-hydroxysuccinimide active method and the CDI method to prepare the immunogen and coating antigen, respectively. The anti-AR73 antibody were obtained and purified by the caprylic acid-ammonium sulfate method. Based on the IgG, an indirect competitive ELISA method and optimum reaction conditions for detection of AR73 was developed. The half of inhibition concentration(IC_{50}) was 45.39 $\mu\text{g/L}$, the limit of detection for acid red 73 was 5.64 $\mu\text{g/L}$, and the cross-reactivity study showed that the polyclonal antiserum were highly specific to AR73, and no cross-reactivity was detected between the obtained polyclonal antiserum and the other competitors (Congo Red, Phenol Red, Safranin, Basic Fuchsin and Carmine) except to Sudan red III (0.15%). The recoveries from the standards fortified blank samples were in the range of 71.3%~84.4% with Coefficient of Variance lower than 9.55%. This developed method can be used to determine the acid red 73 residue in shrimps, and can help to prepare the monoclonal antibody and develop the rapid test kits for acid red 73.

Key words: Shrimps; Acid Red 73; Active ester method; CDI method; ELISA

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)15-0298-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.054

酸性红 73 (Acid red 73, AR73) 俗称酸性大红 GR, 相对分子质量为 556.48, 有中等毒性, 强致癌性, 遗传毒性^[1-3]。在印染业中属禁用“致癌染料”。有研究表明 AR73 能以很高的亲和力与人血清白蛋白 (HAS) 结合从而影响其正常的生理功能^[4-5]。因此, 世界很多国家已明令禁止在食品中添加, 但由于

AR73 有较强的着色能力, 一些食品加工企业仍将其非法作为虾、肉等食品着色剂使用。

目前国内外关于虾仁中 AR73 检测方法的文献报道较少, 2008 年, 宁尚勇等运用反相液相色谱法建立了测定虾仁中合成色素 (酸性大红 GR、金黄粉、橙黄 G、酸性红 1 号、酸性红 26) 的方法, 此方法对酸性

收稿日期: 2014-10-08 + 并列第一作者。

作者简介: 常向彩 (1987-), 男, 硕士, 主要从事兽医免疫学及药物残留快速检测等研究, E-mail: changxiangcai31@126.com。

韦国陆 (1992-), 男, 本科, 研究方向: 生物科学, E-mail: 1640175774@qq.com。

* 通讯作者: 杨晓农 (1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事小动物疾病方面的研究, E-mail: yangxn058@163.com。

基金项目: 贵州省科技厅联合基金项目 (黔科合 J 字 LKA[2013]09 号)。

大红 GR 的 LOD 为 $0.04 \mu\text{g/g}$, 相关系数大于 0.9998^[6]。2012 年, 有文献报道, 采用 N-羧基琥珀亚胺活性酯法将酸性红 73 分别与牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA) 偶联合成了免疫原和包被原, 获得的抗血清可以实现对酸性红 73 的检测, 此方法的 IC_{50} 为 $181.15 \mu\text{g/L}$, LOD 为 $7.93 \mu\text{g/L}$, 空白添加回收率范围为 63.5%~90.7%, $\text{RSD} < 6.76\%$, 但该方法未进行 ELISA 反应条件的优化和实际样品的检测^[7]。液相色谱等仪器检测方法具有假阳性率低、精确度高等优点, 但是检测过程繁琐, 耗时, 成本高, 设备昂贵且操作难度大, 只适用于实验室检测和单样本检测。ELISA 检测方法以操作简便、方法灵敏、高效、快速、适用范围广等优点在最近几年得到了快速发展, 通常用于药物残留检测时的快速筛选^[8]。

本实验主要分析了活性酯法和 N,N-羧基二咪唑 (CDI) 法所合成 AR73 人工抗原的免疫原性, 同时对虾仁中检测 AR73 间接 ELISA 方法的反应条件进行了优化, 进一步丰富了 ELISA 检测方法的实际应用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

酸性红 73 标准品 日本 TCI 公司; GR; 牛血清白蛋白 BSA 北京 J&K 公司; 卵清蛋白 (OVA)、弗氏佐剂、TMB 美国 Sigma 公司; 预染蛋白 Marker 美国 Thermo 科技公司; N,N-羧基琥珀亚胺 (NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP)、吡啶 成都艾德化工有限公司; N,N-羧基二咪唑 (CDI) 等其他试剂购自成都科龙化工试剂厂; 除酸性红 73 外其他试剂均为 AR。

溶液系统: CBS: 0.05 mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液; PBS: 0.01 mol/L pH7.2 的磷酸盐缓冲液; Tris-HCl: 0.05 mol/L pH7.2 的 Tris-HCl 缓冲液; PBST: 含有 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液; 0.1% 明胶-PBST: 含有 1% 明胶的 PBST 溶液; TMB-乙醇: 含有 1% TMB 的乙醇溶液与底物缓冲液混合后加入 0.75% 的过氧化氢溶液 $32 \mu\text{L}$ 所得; TMB-DMSO: 含有 1% TMB 的 DMSO 溶液与底物缓冲液混合后加入 0.75% 的过氧化氢溶液 $32 \mu\text{L}$ 所得; 以上溶液按文献报道的方法配制^[9]。

健康新西兰白兔 6 只 (均为雌性, 7~8 月龄, 体重约为 3.5 kg), 购自四川大学华西医院实验动物中心。

通用型电泳仪 164-5070 及凝胶成像系统 美国 BIO-RAD 公司; Centrifuge 5804R 台式高速大容量冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; DU-800 紫外/可见分光光度计 美国 Beckman Coulter 公司; 超纯水仪 Milli-Q 美国 Millipore 公司; 90-2 型恒温磁力搅拌器 上海青浦沪西仪器厂; 透析袋 (截留分子量 $8000 \sim 14000$) 及专用夹 上海生工生物公司; 隔水式恒温培养箱 上海齐欣科学仪器有限公司; 96 孔可拆酶标板 美国 Costar 公司; Model 680 型酶标仪 美国 BIO-RAD 公司; E-3000 型旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 人工抗原的合成与鉴定 参照活性酯法^[7]和 N,N-羧基二咪唑法^[10]将 AR73 分别与牛血清白蛋白偶联, 合成酸性红 73-半琥珀酸酯-牛血清白蛋白 (AR73-HS-BSA) 和酸性红 73-牛血清白蛋白 (AR73-BSA), 用作免疫原。以同种方法将 BSA 换成 OVA, 合成酸性红 73-半琥珀酸酯-卵清蛋白 (AR73-HS-OVA) 和酸性红 73-卵清蛋白 (AR73-OVA), 用作包被原。所得人工抗原用生理盐水在 4°C 环境下搅拌透析 5 d, 换液 10 次后, 采用紫外扫描法和 SDS-PAGE 法对其进行鉴定, 人工抗原结构式如图 1 所示 (Protein 为 BSA 或 OVA)。人工抗原的偶联比 (Ca/Cb) 按以下公式计算: $\text{Ca/Cb} = (A_{\text{偶}274} \times K_{\text{BSA}280} - A_{\text{偶}280} \times K_{\text{BSA}274}) / (A_{\text{偶}280} \times K_{\text{AR73}274} - A_{\text{偶}274} \times K_{\text{AR73}280})$ 。

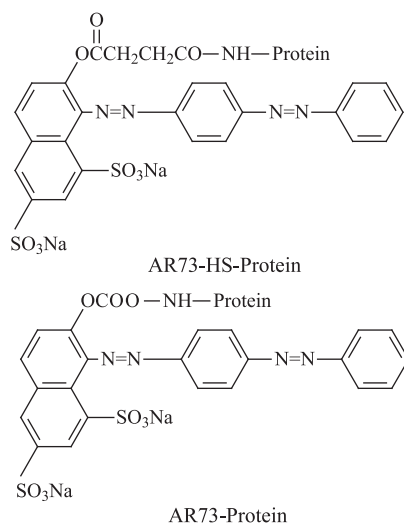


图 1 AR73 人工抗原的结构式

Fig.1 Chemical structure of Artificial antigen

1.2.2 多克隆抗体的制备与纯化 6 只健康成年新西兰大白兔 (编号 R1~R6), 采用注射器法将免疫原与等量弗氏佐剂乳化后, 按 1 mg/只 的量进行皮下多点注射, 免疫间隔周期为 2 周, 共免疫 7 次。AR73-HS-BSA 免疫 R1~R2, AR73-BSA 免疫 R3~R4, R5 和 R6 分别作为各组的免疫对照, 抗体血清以辛酸-饱和硫酸铵法提取 IgG, -20°C 分装冻存^[11]。

1.2.3 间接 ELISA 方法反应体系的建立与优化 将两种包被原与来自免疫原的抗体 R1 和 R2 分成四种组合, 采用方阵滴定法评价 ELISA 的检测能力, 以 $\text{P/N} \geq 2.1$, 即 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 大于 2 倍阴性对照孔的血清最高稀释倍数作为血清的 ELISA 效价, 同时选择 OD 值在 1.3 左右的抗原浓度和血清稀释度为最适工作浓度。利用包被原和抗体的最佳组合, 按文献报道操作进行 ELISA 方法的建立^[12], 将无竞争物时的 OD 值作为 B_0 值, 各浓度竞争物抑制时的 OD 值作为 B 值, 以 B/B_0 (结合率) 为纵坐标, 以各竞争物浓度的对数 ($\lg C$) 为横坐标, 绘制竞争抑制曲线。将产生 50% 和 20% 抑制时的竞争物浓度定义为本方法对该竞争物的 IC_{50} 和 LOD。以此为基础, 分别对包被液及包被方式、封闭液、抗体稀释液及温育时间、底物及

表1 ELISA 方法的优化程序
Table 1 Optimization procedure of the ELISA

包被液	包被方式	封闭液	封闭时间	抗体稀释液	温育时间	底物	温育时间
CBS	4℃过夜	0.5% 明胶	30 min	PBST	60 min	TMB-乙醇	10 min
PBS	4℃过夜	1% 明胶	30 min	0.1% 明胶-PBST	60 min	TMB-DMSO	10 min
Tris-HCl	4℃过夜	0.5% 胎牛血清	30 min	PBST	90 min	TMB-乙醇	15 min
CBS	37℃, 2 h	1% 胎牛血清	30 min	0.1% 明胶-PBST	90 min	TMB-DMSO	15 min
PBS	37℃, 2 h	-	-	PBST	120 min	TMB-乙醇	20 min
Tris-HCl	37℃, 2 h	-	-	0.1% 明胶-PBST	120 min	TMB-DMSO	20 min

反应时间等 ELISA 反应体系进行优化(优化程序见表1),分析不同条件下的 IC₅₀、最大吸光值(A_{max})以及 A_{max}/IC₅₀等反应参数,选择 A_{max}/IC₅₀最大值所对应的条件为最佳反应体系,重新建立 AR73 的竞争抑制曲线。

1.2.4 方法的特异性检测 将 AR73 标准品溶液依次换成系列浓度的苏丹红 3 号、番红花红、苯酚红、刚果红、碱性品红和胭脂红等另外 6 种竞争物,计算 IC₅₀和交叉反应率(CR),评价 ELISA 方法的特异性。CR 按 AR73 的 IC₅₀与竞争物 IC₅₀的百分比计算。

1.2.5 方法准确度的评价 称 6 g 空白虾仁,剪碎后平均分成 3 组,按 10 ng/g、30 ng/g 和 50 ng/g 添加 AR73,加样品提取液(乙醇:氨水:水 = 7:2:1)5 mL,超声萃取 20 min,8000 r/min 离心 10 min,取上清液旋转蒸干,残留物以 2 mL PBS 复溶进行空白样品的标准添加回收实验,进行空白样品的标准添加回收实验,评价所建立方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的鉴定

AR73 属于半抗原,必须将其合成人工抗原后方可产生抗体。Goodrow 等^[13]提出对于人工抗原的合成应该掌握以下原则:载体蛋白偶联的半抗原分子应与待检测分子具有相似的立体构象、形状及电子分布;偶联物的“间隔臂”不宜过长,注意避免“臂抗体”的产生;半抗原分子含有的活性基团与载体蛋白偶联后,对待测分子不造成影响;偶联物应具有与待测分子相同的基本结构。基于以上几点原则,本实验首先对 AR73 结构上的羟基进行修饰,引进一个带有羧基的活性基团,得到酸性红 73 的衍生物,以改进的活性酯法与载体蛋白偶联,合成了两种具有较长“间隔臂”的人工抗原;采用改进的 N,N-羰基二咪唑法,将 AR73 分子上的羟基直接与载体蛋白偶联,合成了另外两种较短“间隔臂”的人工抗原。所得四种人工抗原经透析纯化后,半抗原的红色始终存在且全波长紫外扫描图谱显示(图2),偶联物兼具载体蛋白(276 nm)和 AR73(514 nm)的相似特征峰,因此可初步判定半抗原与载体蛋白偶联成功。AR73-HS-BSA、AR73-HS-OVA、AR73-BSA、AR73-OVA 的偶联比分别为 12:1、13:1、9:1、5:1。SDS-PAGE 结果显示偶联物的条带比较粗且滞后于载体蛋白(图3),由此可以大致判定本方法具有较好的偶联效果。

2.2 最佳组合与最适工作浓度的确定

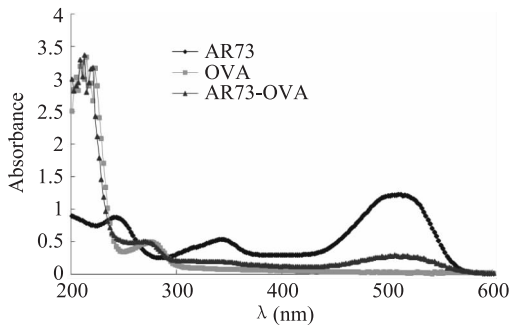


图2 AR73,OVA,AR73-OVA 的紫外扫描图
Fig.2 The UV-scanning of AR73, OVA and AR73-OVA

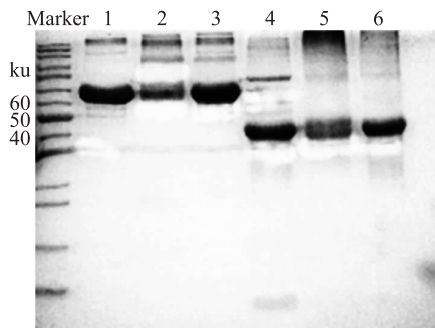


图3 蛋白载体与偶联物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图
Fig.3 SDS polyacrylamide gel electrophoresis map for protein carrier and conjugates
注:1.BSA;2.AR73-HS-BSA;3.AR73-BSA;4.OVA;5.AR73-HS-OVA;6.AR73-OVA。

在以往文献报道中^[14-17],异源包被模式被证实可以用于优化 ELISA 方法。为优化 ELISA 方法,将两种包被抗原和来自两种免疫抗原的抗体分入 4 种组合评价检测能力。方阵滴定实验显示(结果见表2),在两组免疫动物中,抗体 R1 和抗体 R3 在各组中的血清效价最高,但 IC₅₀结果表明抗体 R1 优于抗体 R3,即采用活性酯法合成的包被原和免疫原所得抗体(组合1)优于 CDI 法等其他组合,因此,选择 1 号兔子的抗体用于后继实验。造成实验中组合 1 优于其他组合的原因之一,可能是 CDI 法合成的人工抗原偶联比较低,Schneider 等^[18]认为最合适的偶联比为 10~20,本实验中 CDI 法合成的免疫原和包被原的偶联比仅为 9 和 5,但也有其他实验表明^[19],诱导抗体产生的决定性因素并非是偶联比,偶联比为 1 时也可以获得高亲和力的抗体,只是免疫应答较慢;另外一个原因可能是 CDI 法所得的人工抗原间隔臂过

短,Frieia^[20]认为拥有 3~6 个碳原子直链的间隔臂最佳,间隔臂过短,载体蛋白的空间位阻则会影响动物免疫系统,难以识别半抗原的特征结构,而且蛋白载体的局部化学环境会造成半抗原的立体结构的改变,CDI 法所得偶联物为只有一个碳原子间隔臂的人工抗原,或许导致 AR73 特征结构暴露不完全,从而难以诱导机体产生特异性更强的抗体。

2.3 间接 ELISA 方法的优化结果

通过 ELISA 反应体系优化结果可知(表 3),在 37 ℃ 温度下采用 CBS 包被 2 h、1% 明胶封闭 30 min、含有 0.1% 明胶的 PBST 溶液稀释抗体温育 60 min 并以 TMB-DMSO 为底物反应 15 min 时,A_{max}/IC₅₀ 的值最大,可作为该方法的最佳反应条件。重新建立 AR73 的竞争抑制曲线(图 4),结合率与 lgC 之间的线性方程为 Y = -33.122X + 104.89, R² = 9714。经计算 IC₅₀ 为 45.39 μg/L, LOD 为 5.64 μg/L。

2.4 方法的特异性

特异性是指抗体对相应抗原或相似抗原的识别能力,ELISA 检测方法的特异性通常以交叉反应率来

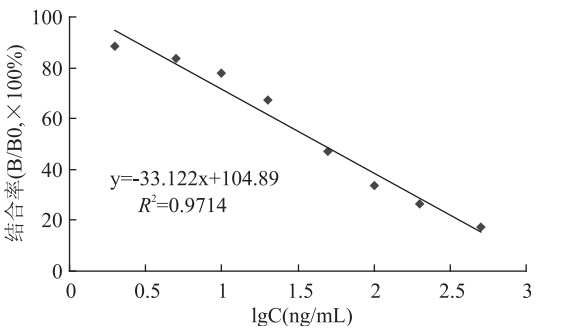


图 4 ELISA 的标准曲线

Fig.4 The standard inhibition cure of ELISA

表示。交叉反应率实验显示,所建立的间接 ELISA 方法与苏丹红 3 号、刚果红等其他竞争物几乎不存在交叉反应(表 4),说明该方法具有较高的特异性。

2.5 方法的准确度

评价一种分析方法同时也要考虑到样品基质的影响,以便分析方法准确度和精密度。通过在空白虾仁中添加三种不同浓度的 AR73 标准品,计算添加

表 2 ELISA 方法中四种组合的稀释度

Table 2 Optimized reagent dilutions in the four combinations

组合	包被原	最适浓度	抗体	最适浓度	IC ₅₀ (μg/L)
1	AR73-HS-OVA	1:256000	R1	1:2000000	70.6
2	AR73-HS-OVA	1:32000	R3	1:128000	836.63
3	AR73-OVA	1:4000	R1	1:4000	> 10000
4	AR73-OVA	1:4000	R3	1:8000	> 10000

表 3 ELISA 反应体系优化结果

Table 3 The results of optimum reaction system for ELISA

反应体系	缓冲液	反应时间	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max}	A _{max} /IC ₅₀
包被液	CBS	4 ℃ 过夜	70.6	0.928	0.013
	PBS	4 ℃ 过夜	353.24	0.759	0.002
	Tris-HCl	4 ℃ 过夜	883.97	1.003	0.001
	CBS	37 ℃, 2 h	49.19	0.948	0.019
	PBS	37 ℃, 2 h	92.3	0.608	0.007
	Tris-HCl	37 ℃, 2 h	315.97	0.686	0.002
封闭液	0.5% 明胶	30 min	133.47	0.695	0.005
	1% 明胶	30 min	50.42	0.93	0.018
	0.5% 胎牛血清	30 min	> 1000	1.518	< 0.001
	1% 胎牛血清	30 min	> 1000	1.508	< 0.001
	PBST	60 min	51.41	0.729	0.0141
	0.1% 明胶-PBST	60 min	45.56	1.154	0.0253
抗体稀释液	PBST	90 min	120.54	0.461	0.003
	0.1% 明胶-PBST	90 min	124.28	0.425	0.003
	PBST	120 min	91	0.6	0.006
	0.1% 明胶-PBST	120 min	76.95	0.544	0.007
	TMB-乙醇	10 min	75.05	0.462	0.006
	TMB-DMSO	10 min	70.10	0.682	0.009
底物	TMB-乙醇	15 min	71.56	0.544	0.008
	TMB-DMSO	15 min	45.39	1.001	0.0221
	TMB-乙醇	20 min	45.72	0.901	0.0197
	TMB-DMSO	20 min	50.3	0.963	0.013

表4 抗血清与几种抑制物的交叉反应率

Table 4 Cross-reactivity of anti-serum with some competitors

	酸性红 73	苏丹红 3 号	刚果红	苯酚红	番红花红	碱性品红	胭脂红
IC ₅₀ (μg/L)	45.39	2.97 × 10 ⁴	1.07 × 10 ⁶	—	—	—	—
CR (%)	100	0.15	0.004	—	—	—	—
LOD (μg/L)	5.64	—	—	—	—	—	—

注:—:未检出(Not determined)。

回收率和变异系数,来评估此法的准确度和精密度。添加回收率范围一般为 60%~120%,最佳范围在 80%~100%,本实验所建立间接 ELISA 方法的添加回收率范围为 71.3%~84.4%,RSD < 9.55%,说明本方法准确可靠且平行性较好。

表5 AR73 在空白虾仁中的添加回收率(n=6)

Table 5 Recoveries of the AR73 from blank shrimps(n=6)

添加值 (ng/g)	测定平均值 (ng/g)	添加回收率 (%)	变异系数 (%)
10	7.13	71.3	6.92
30	22.09	73.6	8.95
50	42.18	84.4	9.55

3 结论

本实验采用活性酯法和 CDI 法合成了 AR73 的人工抗原,经紫外扫描法和 SDS-PAGE 电泳鉴定半抗原与载体蛋白偶联成功,并对 ELISA 反应体系进行优化,建立了酸性红 73 的间接竞争 ELISA 检测方法。所制备的人工抗原及获得的抗体,具有高稀释倍数和较高的抗体效价,为下一步制备单克隆抗体,筛选出高特异性、灵敏度高的单抗具有一定的参考价值。但是由 CDI 法合成的免疫原未能诱导机体产生强特异性抗体,未能达到异源包被优化 ELISA 方法的目的。因此,对于 AR73 有待于通过不同方法,筛选出一种新型具有高活性的人工抗原,更大程度的提高 ELISA 检测的特异性和灵敏度,以便于推广该方法在食品、药材等其他方面的应用。

参考文献

- [1] Stiborova M, Martinek V, Rydlova H, et al. Sudan I is a potential carcinogen for humans; evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes[J]. Cancer Research, 2002, 62 (20): 5678-5684.
- [2] Stiborova M, Martinek V, Rydlova H, et al. Expression of cytochrome P450 1A1 and its contribution to oxidation of a potential human carcinogen 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in human livers[J]. Cancer Letters, 2005, 220 (2): 145-154.
- [3] Dawkar V V, Jadhav U U, Kagalkar A N, et al. Govindwar Decolorization and detoxification of sulphonated azo dye Red HE7B by Bacillus sp. VUS [J]. World J. Microbiol. Biotechnol., 2010, 26 (5): 909-916.
- [4] Guo Y M, Yue Q Y, Gao B Y, et al. Probing the molecular mechanism of C.I. Acid red 73 binding to human serum albumin [J]. Environ. Toxicol. Phar., 2010, 30 (1): 45-51.
- [5] Guo Y M, Yue Q Y, Gao B Y, et al. Molecular docking study

investigating the possible mode of binding of C.I. Acid Red 73 with DNA [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2011, 49 (1): 55-61.

[6] 宁尚勇,高洁,许志强,等.反相液相色谱法同时检测虾仁中合成色素的研究[J].分析实验室,2008,27(4):73-75.

[7] 常向彩,杨晓农,宋定州,等.酸性红 73 多克隆抗体的制备及应用[J].分析化学,2012,40(10):1593-1597.

[8] 李冰,李剑勇,周绪正,等.动物性食品中兽药残留分析检测技术研究进展[J].畜牧与兽医,2012,44(5):82-86.

[9] 宋姗姗.食品中罗丹明 B 的残留免疫检测方法的研究[D].无锡:江南大学,2011.

[10] Zhao D, He L, Pu C, et al. A highly sensitive and specific polyclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibiotic olaquidox in animal feed samples [J]. Anal. Bioanal. Chem., 2008, 391 (7): 2653-2661.

[11] 常向彩,杨晓农,朱子凤,等.两种纯化兔抗酸性红 73 免疫球蛋白 G 方法的比较研究[J].中国畜牧兽医,2013,40(7):124-126.

[12] Chang X C, HU X Z, Li Y Q, et al. Multi-determination of para red and sudan dyes in egg by a broad-specific antibody based enzyme linked immunosorbent assay [J]. Food Control, 2011, 22 (11): 1770-1775.

[13] Goodrow M H, Hammock B D. Hapten design for compound 2 selective antibodies: ELISA for environmentally deleterious small molecules [J]. Analytica Chimica Acta, 1998, 376 (1): 83-91.

[14] Li J, Liu J, Zhang H, et al. Broad-specificity indirect competitive ELISA for determination of nitrofurans in animal feeds [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 678 (1): 1-6.

[15] Galve R, Sanchez-Baeza F, Camps F, et al. Indirect competitive immunosorbent assay for trichlorophenol determination: Rational evaluation of the competitor heterology effect [J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 452 (2): 191-206.

[16] 谢桂勉,孙远明,徐振林,等.新型含硫半抗原的晶体结构、构象分析及其电性研究[J].高等学校化学学报,2009,30(11):2193-2198.

[17] Franek M, Diblikova I, Cernoch I, et al. BrOAd-specificity immunosorbent assays for sulfonamide detection: immunochemical strategy of generic antibodies and competitors [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78 (5): 1559-1567.

[18] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunosorbent assay for Striazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. J. Agric. Food Chem., 1992, 40 (3): 525-530.

[19] Parker C W. 生物活性化合物的放射免疫测定法[M].北京:科学出版社,1981:165.

[20] Freia J. Detection of pesticides residues by enzyme-immunosorbent assay [J]. Pestic. Sci., 1989 (26): 303-307.