

胶体金试纸条同时检测鲤鱼中 7 种苯并咪唑类药物的残留

张彩芹¹, 张勋², 李洁¹, 李娜¹, 肖香¹, 欧阳琴¹, 王云¹, 周兴华¹

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013) (2. 江苏美正生物科技有限公司, 江苏无锡 214000)

摘要: 为检测鲤鱼中苯并咪唑类药物残留, 降低其对人体造成的危害, 本文基于单克隆抗体之上建立胶体金试纸条检测方法。首先以 2-甲氧基羰基氨基-3H-苯并咪唑-5-羧酸为半抗原, 用活化酯法偶联蛋白质制备免疫原, 免疫小鼠, 进行细胞融合制备单克隆抗体, 而后用合成的胶体金标记单克隆抗体制备胶体金试纸条。通过间接竞争 ELISA 法 (ic-ELISA) 测得阿苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑的半抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.44、0.16、3.47、5.62、0.62、0.10、5.77 ng/mL。胶体金试纸条在鲤鱼中的阿苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑的检测限分别为 4、2、50、100、10、1、100 ng/g, 检测时间为 15 min。因此, 该方法灵敏度高、成本低、速度快且无需仪器辅助, 适宜现场大量鲤鱼样本的快速检测。

关键词: 苯并咪唑; 单克隆抗体; 胶体金试纸条; 鲤鱼

文章编号: 1673-9078(2020)06-291-296

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1263

Simultaneous Detection of 7 Benzimidazoles Residues in Carp by Colloidal Gold Immunochromatographic Strip

ZHANG Cai-qin¹, ZHANG Xun², LI Jie¹, LI Na¹, XIAO Xiang¹, OUYANG Qin¹, WANG Yun¹, ZHOU Xing-hua¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

(2. Jiangsu MeiZheng Biological Technology Co. Ltd., Wuxi 214000, China)

Abstract: In order to reduce its harm to human, a colloidal gold immunochromatographic strip was established based on monoclonal antibody (mAb) to detect the residue of benzimidazoles in carp. Firstly, the immunogen was prepared using 2-(methoxycarbonylamino)-3H-benzimidazole-5-carboxylic acid as hapten and coupling protein by activated ester method, mice were immunized and mAb was prepared by cell fusion. Then A colloidal gold immunochromatographic strip was prepared by mAb labelled with synthetic colloidal gold. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of albendazole, mebendazole, albendazole s-oxide, albendazole sulfone, fenbendazole flubendazole, oxfendazole were 0.44, 0.16, 3.47, 5.62, 0.62, 0.10, 5.77 ng/mL by ic-ELISA, respectively. The limit of detection (LOD) of albendazole, mebendazole, albendazole s-oxide, albendazole sulfone, fenbendazole, flubendazole, oxfendazole were 4, 2, 50, 100, 10, 1, 100 ng/g in carp samples, respectively. Therefore, the developed method was highly sensitive, rapid, low-cost, free-instrument and applicable for on-site detection of a large numbers of carp samples.

Key words: benzimidazoles; monoclonal antibody; colloidal gold immunochromatographic strip; carp

引文格式:

张彩芹, 张勋, 李洁, 等. 胶体金试纸条同时检测鲤鱼中 7 种苯并咪唑类药物的残留[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 291-296

ZHANG Cai-qin, ZHANG Xun, LI Jie, et al. Simultaneous detection of 7 benzimidazoles residues in carp by colloidal gold immunochromatographic strip [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 291-296

苯并咪唑类药物 (Benzimidazoles, BMZs) 是一种广谱性抗蠕虫药物, 通过抑制虫体对葡萄糖的摄入,

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1600801)

作者简介: 张彩芹 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 周兴华 (1982-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

导致糖源的耗尽, 使虫体无法生存^[1]。目前被广泛应用于鱼类指环虫、三代虫等寄生虫病的治疗^[2], 且效果显著。苯并咪唑类药物均含有一个母环结构, 如图 1 所示, 根据 2 位取代基的不同可分为三类: 第一类取代基是氨基甲酸酯, 包括阿苯达唑、甲苯咪唑、芬苯达唑等; 第二类取代基是噻唑, 包括噻菌灵及其代

谢物；第三类为其他类，包括三氯苯达唑等。苯并咪唑类药物虽然杀虫效率高，但是相关的动物实验研究^[3]表明苯并咪唑类药物存在致畸性和致突变性，大量使用会造成药物在鱼体内残留，为鱼的安全性带来一定的隐患，同时也会通过食物链进入人体，对人体造成一定的伤害。为保证动物源性食品的安全性，国内外均对苯并咪唑类药物残留做出了相关限量规定。我国对动物性食品中兽药最大残留限量有严格规定，甲苯咪唑的残留限量为 60~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，阿苯达唑的残留限量为 100~5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，氟苯咪唑的残留限量是 10~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所以急需建立一种高效、快速地监测动物性食品中苯并咪唑类药物残留的检测方法。

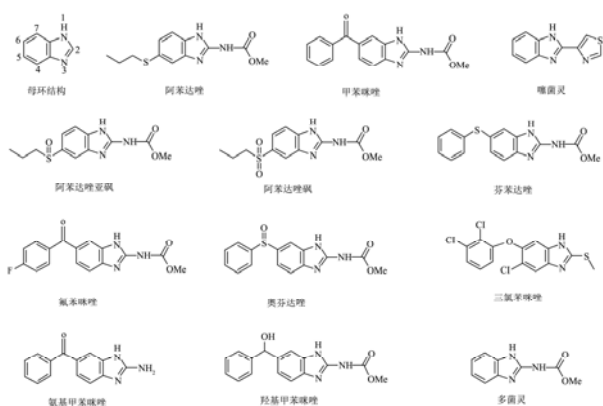


图1 苯并咪唑类药物结构式

Fig.1 The structure of benzimidazoles

目前，苯并咪唑类药物的检测方法主要集中在液相色谱-串联质谱法^[4,5](LC-MS)、高效液相色谱^[6-8](HPLC)等仪器分析方法。这些仪器分析方法虽然灵敏度和准确度高，但是需要昂贵的仪器设备、专业的操作人员、前处理复杂且耗时长。因此，不适宜大量样本的快速检测。免疫层析法是基于抗原抗体特异性反应的一种检测方法，该方法成本低，检测时间短、灵敏度高且适宜现场大量样本的快速筛选^[9]。本文通过制备灵敏度高的抗苯并咪唑类药物单克隆抗体，采用胶体金标记单克隆抗体建立检测限低、稳定性高、可视觉判读检测结果的胶体金试纸条检测方法。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器设备

鲤鱼购于超市；2-甲氧基羰基氨基-3H-苯并咪唑-5-羧酸、甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、阿苯达唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑、三氯苯达唑、多菌灵、噻菌灵均购自于上海百灵威科技有限公司；牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、辣根过氧化物酶标记的

羊抗鼠 IgG、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、碳二亚胺(EDC)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、氯金酸($\text{HAuCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、柠檬酸钠均购自美国 Sigma 公司；胎牛血清、HAT、HT、RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司。

GENESYS 紫外分光光度计，美国 Thermo；1201-7044 酶标仪，美国 Thermo；MB-1 酶标板脱水机，北京中科飞亚有限公司；真空冷冻干燥机，德国 Neaspec 公司；XD-202 倒置显微镜，江南永新光学有限公司；XYZ3000 划膜喷金仪、RC13040 滚式切条机，上海金标生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫原和包被原的合成与鉴定

如图2所示，以2-甲氧基羰基氨基-3H-苯并咪唑-5-羧酸为半抗原，采用活化酯法^[10]偶联蛋白合成免疫原和包被原。称取3 mg 半抗原，溶于0.5 mL 二甲甲酰胺(DMF)中，向其中加入2.8 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和5 mg 1-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)，将混合物在室温下搅拌6 h进行活化。将20 mg 牛血清白蛋白(BSA)和12 mg 卵清白蛋白(OVA)充分地溶解在6 mL 碳酸盐(CBS)缓冲液中，然后在磁力搅拌下将已活化的半抗原溶液逐滴地加到蛋白质溶液中。将混合物在4 °C下搅拌反应12 h，用磷酸盐(PBS)缓冲液于4 °C透析72 h，并在透析过程中更换透析液8~10次，透析结束后分装，于-20 °C保存备用。最后用紫外分光光度计进行全波长扫描以鉴定偶联是否成功^[11]。

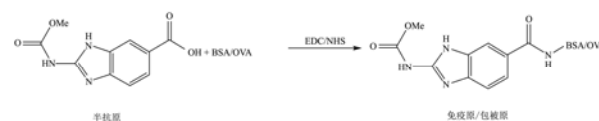


图2 免疫原和包被原的合成

Fig.2 Synthesis of immunogen antigen and coating antigen

1.2.2 单克隆抗体的制备

首次免疫将制备的免疫原与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后，通过背部皮下多点注射的方式免疫小鼠(Balb/C，雌性，6~8周)，每只小鼠的免疫量为100 μg 。之后每隔三周对小鼠进行加强免疫，将免疫原和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化，以与首次免疫相同的方式进行免疫，每只小鼠的免疫量为50 μg 。从第三次免疫开始，通过ic-ELISA^[12]方法对小鼠血清进行检测，筛选出效价高和抑制率高的小鼠进行细胞融合。将小鼠脾脏细胞和骨髓瘤细胞以10:1的比例进行融合，用ic-ELISA对细胞上清液进行筛选，选择抑制率高、阳性强的细胞株进行亚克隆，并进行扩大培养，

进行2~3次亚克隆后,获得纯度较高的阳性杂交瘤细胞株。将上述筛选的杂交瘤细胞稀释至每毫升的 1×10^6 /细胞,每只小鼠按照800 μL 进行腹腔注射。待小鼠腹部肿大后,采集腹水于3500 r/min离心10 min,收集上清液用正辛酸-硫酸铵进行纯化,得单克隆抗体^[13]。

1.2.3 抗体灵敏度和特异性的测定

以 IC_{50} 来评价抗体的灵敏度,通过ic-ELISA法,以 OD_{450} 为纵坐标,阿苯达唑浓度的对数为横坐标,应用Origin软件进行Logistic四参数曲线拟合即可计算其 IC_{50} 。

以结构类似物的交叉率来评价抗体的特异性,采用ic-ELISA法测定抗体对其 IC_{50} ,再按照下列公式计算交叉率(CR):

$$\text{CR} / \% = [\text{IC}_{50}(\text{阿苯达唑}) / \text{IC}_{50}(\text{结构类似物})] \times 100\%$$

1.2.4 金标抗体的制备

胶体金的制备采用了经典的柠檬酸三钠还原法并加以修改^[14]。取800 mL的超纯水于烧瓶中,在102 $^{\circ}\text{C}$ 中加热沸腾平衡30 min。在磁力搅拌下加入1.6 mL的10%氯金酸溶液,10 min后加入2.08 mL 10%柠檬酸三钠溶液,继续搅拌直至溶液颜色变成深红色且稳定不变色,冷却至室温保存备用。取3 mL的胶体金溶液,加入300 μL 的pH 8.5的硼酸缓冲液,充分混匀之后逐滴加入18 μg 抗体溶液反应1 h。然后向上述溶液中逐滴加入300 μL 10% BSA封闭没有结合的位点以减少试验中的非特异性吸附,在室温下孵育0.5 h。将溶液于4 $^{\circ}\text{C}$,10000 r/min离心25 min以除去没有结合的抗体和胶体金,弃去上清液,将沉淀物溶于200 μL 重悬液(含2% BSA、1%蔗糖、0.02%叠氮化钠的PBS溶液)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将上述制备的金标抗体稀释20倍,取50 μL 于96孔板中进行冷冻干燥。

1.2.5 胶体金试纸条的制备

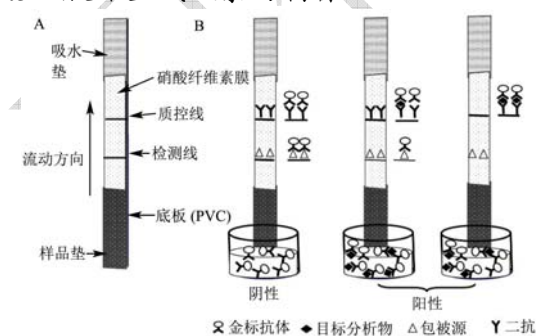


图3 胶体金试纸条结构示意图(a)和原理图(b)

Fig.3 The structure (a) and schematic (b) of gold immunochromatography Assay

胶体金试纸条由样品垫、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水垫、底板(PVC)组成^[15]。如图3a所示,将NC

膜贴在底板中间,将吸水垫和样品垫分别贴在NC膜上下两边,与NC膜重叠约2 mm。在组装前将样品垫于含有0.2%(V/V)吐温20、1%(m/V)蔗糖、1%(V/V)BSA的0.01 M PBS(pH 7.4)浸泡8 h以减少基质干扰,而后于37 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥。将包被原(0.8 mg/mL)和二抗(0.4 mg/mL)分别用喷膜仪喷在NC膜上作为检测线(T线)和质控线(C线),然后37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱过夜。最后将其纵向切成3.8 mm的试纸条,干燥箱中保存备用。

如图3b所示,取150 μL 的样本提取液加入含有金标抗体偶联物孔中,混合均匀后于20~25 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min,而后将试纸条插入孔中。在毛细管作用下,混合物向上爬升时会由于抗原抗体特异性反应被C线上的二抗和T线的包被原捕获而显色。若T线比C线颜色深或一样深度,则该样品中无待测物即为阴性结果。若T线的颜色深度比C线浅或者T线没有颜色,则该样品中含待测物即为阳性结果。若C线没有颜色,则表明该试纸条为失效产品。

1.2.6 实际样本检测

取5 g均质后的鲤鱼样本置于50 mL离心管中,加入不同浓度的标准品,加入3 mL氨水和7 mL乙酸乙酯,震荡混匀3 min,室温下4000 r/min,离心5 min。取4 mL的上层液体于7 mL离心管中,置60 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹仪上吹干,再用2 mL的正己烷溶解残渣,加入0.5 mL PBST(0.5%吐温20的磷酸盐缓冲液),震荡均匀后于室温4000 r/min,离心3 min,去除上层有机相,取下层水相用于检测。

1.2.7 数据处理

每组数据做三个平行,取其平均值用OriginPro 9.0软件作图,进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 免疫原和包被原的鉴定

苯并咪唑类药物是一种小分子,不具备免疫原性,需偶联大分子蛋白成为完全抗原才能刺激机体产生免疫反应^[16]。大多数的苯并咪唑类药物的分子结构上没有和蛋白质反应的基团,所以需要引入和蛋白质反应的基团。David^[17]等人从头合成半抗原,在苯并咪唑类药物的母环结构6位上引入羧基,虽然最后得到的抗体对苯并咪唑类药物交叉好,但灵敏度不高,且该合成方法极其复杂,获得抗体难度较大。而本文选择2-甲氧基羰基氨基-3H-苯并咪唑-5-羧酸作为半抗原,此半抗原不仅有和苯并咪唑类药物相似的化学结构,还具有直接和蛋白质反应的羧基。

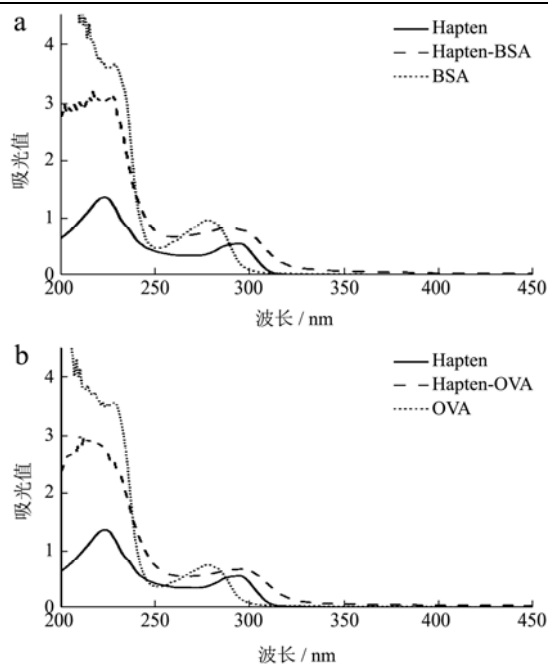


图4 免疫原(a)和包被原(b)紫外吸收光谱

Fig.4 The UV-vis absorption spectrum of (a) immunogen and (b) coating antigen

如图4所示, a 图为免疫原的紫外吸收光谱, 半抗原和 BSA 的紫外吸收峰分别是 295 nm 和 278 nm, 而免疫原的吸收峰为 287 nm, 峰值发生了偏移且峰型也出现了一定的变化。b 为包被原的紫外吸收光谱, 包被原的紫外吸收峰也发生了偏移, 吸收峰位于半抗原和 OVA 中间。综上说明免疫原和包被原偶联成功 [18]。

2.2 抗体灵敏度和特异性

评价抗体灵敏度最有力的指标是 IC_{50} , IC_{50} 越低, 抗体的灵敏度越好。将阿苯达唑标准品稀释为 0.06、0.13、0.25、0.50、1、2、4 ng/mL 七个浓度, 以阿苯达唑标准品浓度的对数为横坐标, 以 OD_{450} 为纵坐标, 通过 Origin 软件绘制其间接竞争抑制曲线。

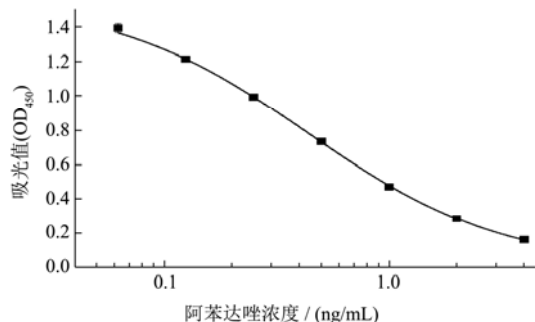


图5 阿苯达唑标准曲线

Fig.5 The standard curve of albendazole

如图5所示, 阿苯达唑单克隆抗体的 IC_{50} 是 0.44 ng/mL, R_2 为 0.999, 相关性较好。如表1所示, 抗体

和其他类的交叉良好, 与甲苯咪唑、氟苯咪唑、芬苯达唑的交叉率分别是 275.00%、440.00%、70.97%。与阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、奥芬达唑的交叉率分别是 12.68%、7.82%、7.63%。而对噻菌灵、三氯苯咪唑、氨基甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、多菌灵几乎无交叉, 这可能是由于抗原决定簇暴露水平不一样所导致 [19]。本研究制备的阿苯达唑、甲苯咪唑、氟苯咪唑和奥芬达唑抗体的灵敏度比郭 [20] 和 David [17] 文献中报道的抗体分别提高了 1~4、2~15 倍。Tsiialla [21] 和彭 [22] 研究中制备的抗体仅特异性识别单一的苯并咪唑类药物, 对其他类的苯并咪唑类药物没有交叉。而本研究制备的抗体不仅与其他类苯并咪唑类药物交叉良好, 且灵敏度高。

表1 抗体交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity results of antibody

药物名称	IC_{50} (ng/mL)	交叉率/%
阿苯达唑	0.44	100.00
甲苯咪唑	0.16	275.00
阿苯达唑亚砷	3.47	12.68
阿苯达唑砷	5.62	7.82
芬苯达唑	0.62	70.97
氟苯咪唑	0.10	440.00
奥芬达唑	5.77	7.63
噻菌灵	>1000	<0.1
三氯苯咪唑	>1000	<0.1
氨基甲苯咪唑	>1000	<0.1
羟基甲苯咪唑	>1000	<0.1
多菌灵	>1000	<0.1

2.3 胶体金表征

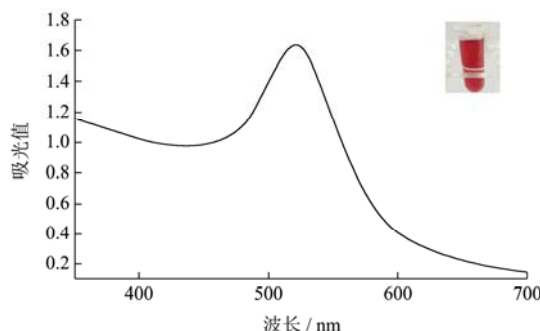


图6 胶体金紫外光谱

Fig.6 The UV-vis spectrum of colloidal gold

胶体金的粒径大小和均一性在金标抗体的制备过程中起到关键作用 [23] 本研究制备的胶体金合成后通过肉眼观察, 颜色呈现清亮透明的酒红色, 如图6所示, 胶体金的紫外吸收峰为 522 nm, 表明胶体金制备成功。图7为胶体金的透射电镜 (TEM) 图, 可以看出

胶体金颗粒大小均匀,计算其粒径大小为 15 nm 左右,分散性较好,无聚集现象,与 Pattarawarapan^[24]文献中报道的结果一致,表明合成胶体金的结果较好。

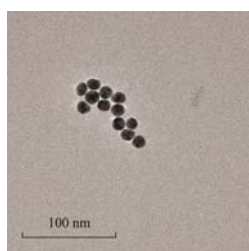


图7 胶体金透射电镜图

Fig.7 The TEM image of colloidal gold

2.4 试纸条检测限的测定

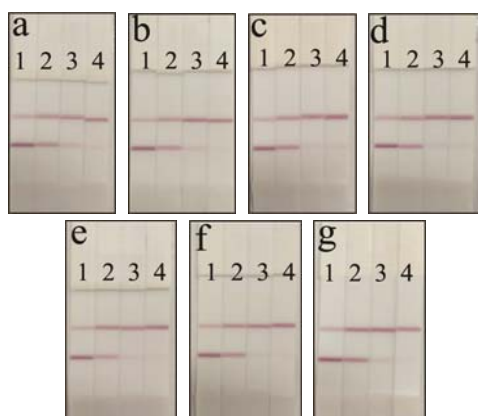


图8 加标鲤鱼样本胶体金试纸条检测结果

Fig.8 The results of colloidal gold

immunochromatographic strip in spiked carp sample

注: (a)阿苯达唑: 0、2、4、8 ng/g; (b)甲苯咪唑: 0、1、2、4 ng/g; (c)阿苯达唑亚砷: 0、25、50、100 ng/g; (d)阿苯达唑砷: 0、50、100、200 ng/g; (e)芬苯达唑: 0、5、10、20 ng/g; (f)氟苯咪唑: 0、0.5、1、2 ng/g; (g)奥芬达唑: 0、50、100、200 ng/g。

按照 1.2.6 的样本处理方法,向空白鲤鱼样本中添加不同浓度的阿苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑的标准品,另外设置阴性对照。将 150 μ L 样本提取液与金标抗体混合均匀,于 20~25 $^{\circ}$ C 下孵育 5 min 后,将试纸条插入孔中,10 min 之内根据 T 线和 C 线颜色深浅,视觉判读检测结果。检测限为与阴性对照相比,T 线颜色比 C 线浅的最低浓度^[25]。结果如图 8 所示,鲤鱼中阿苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑的检测限分别为 4、2、50、100、10、1、100 ng/g。

目前,关于检测苯并咪唑类药物残留的免疫分析方法较少。与现有报道的苯并咪唑类药物残留的免疫分析方法相比,本文中阿苯达唑胶体金试纸条的检测

限比 David^[17]等人制备的 ELISA 方法降低 28 倍,且 ELISA 方法需反复洗板、耗时长、需仪器辅助;甲苯咪唑、氟苯咪唑的检测限皆比郭^[20]等人制备的试纸条方法降低 6 倍。并且本研究的胶体金试纸条的检测限能满足对鲤鱼样本的检测需求。据我们所知,目前还未见关于胶体金试纸条检测鲤鱼中苯并咪唑类药物残留的文献报道。

3 结论

本文以 2-甲氧基羰基氨基-3H-苯并咪唑-5-羧酸为半抗原,成功制备了灵敏度高的抗苯并咪唑类药物的单克隆抗体,基于单克隆抗体之上建立快速检测鲤鱼中 7 种苯并咪唑类药物残留的胶体金试纸条方法,阿苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、芬苯达唑、氟苯咪唑、奥芬达唑的检测限分别为 4、2、50、100、10、1、100 ng/g,满足鲤鱼中药物残留的检测需求,且检测时间为 15 min。因此,本文建立的检测方法简单,灵敏,快速,成本低,结果可视觉判断且适宜现场大量鲤鱼样本中苯并咪唑类药物残留的检测。

参考文献

- [1] Mckellar Q A, Scott E W. The benzimidazole anthelmintic agents: A review [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1990, 13(3): 223-47
- [2] 张洪玉,赵明军,彭翔,等. 苯并咪唑类药物在鱼类上代谢规律及残留检测研究概况[J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(2): 94-100
ZHANG Hong-yu, ZHAO Ming-jun, PENG Xiang, et al. The metabolic rule of the benzimidazoles on fishes and its residue detection technology [J]. Chinese Fishery Abstracts, 2012, 2(2): 94-100
- [3] Longo M, Zanoncelli S, Colombo P A, et al. Effects of the benzimidazole anthelmintic drug flubendazole on rat embryos *in vitro* [J]. Reproductive Toxicology, 2013, 36(2): 78-87
- [4] Chen D, Tao Y, Zhang H, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues [J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(19): 1659-1667
- [5] Wang Y, Li X, Zhang Z, et al. Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food

- Chemistry, 2016, 192(7): 280-287
- [6] Chen D, Tao Y, Liu Z, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk [J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences*, 2010, 878(28): 2928-2932
- [7] Zhang Y, Huang X, Yuan D. Determination of benzimidazole anthelmintics in milk and honey by monolithic fiber-based solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(2): 557-567
- [8] Vichapong J, Santaladchaiyakit Y, Burakham R, et al. Determination of benzimidazole anthelmintics in eggs by advanced microextraction with high-performance liquid chromatography [J]. *Analytical Letters*, 2015, 48(4): 617-631
- [9] Xing C, Jing X, Zhang X, et al. Ultrasensitive indirect competitive ELISA and strip sensor for detection of furazolidone metabolite in animal tissues [J]. *Food Agricultural Immunology*, 2017, 28(6): 1-14
- [10] Lei X, Xu L, Song S, et al. Development of an ultrasensitive ic-ELISA and immunochromatographic strip assay for the simultaneous detection of florfenicol and thiamphenicol in eggs [J]. *Food Agricultural Immunology*, 2018, 29(1): 254-66
- [11] Zeng H, Chen J, Zhang C, et al. Broad-specificity chemiluminescence enzyme immunoassay for (fluoro) quinolones: hapten design and molecular modeling study of antibody recognition [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(7): 3909-3916
- [12] Peng J, Kong D, Liu L, et al. Determination of quinoxaline antibiotics in fish feed by enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody [J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(12): 5204-5209
- [13] Chen Y, Liu L, Xu L, et al. Gold immunochromatographic sensor for the rapid detection of twenty-six sulfonamides in foods [J]. *Nano Research*, 2017, 10(7): 11-12
- [14] Luo L, Xu Z-L, Yang J-Y, et al. A sensitivity-enhanced heterologous immunochromatographic assay based on monoclonal antibody for the rapid detection of histamine in saury samples [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(7): 8833-8840
- [15] Wu W D, Min L, Ming C, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of streptococcus agalactiae in tilapia [J]. *Biosensors Bioelectronics*, 2017, 91(9): 66-69
- [16] Wang K, Vasylieva N, Wan D, et al. Quantitative detection of fipronil and fipronil-sulfone in sera of black-tailed prairie dogs and rats after oral exposure to fipronil by camel single-domain antibody-based immunoassays [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(2): 1532-1540
- [17] Brandon D L, Binder R G, Bates A H, et al. Monoclonal antibody for multiresidue ELISA of benzimidazole anthelmintics in liver [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(7): 1588-1594
- [18] Guo J, Liu L, Xue F, et al. Development of a monoclonal antibody-based immunochromatographic strip for cephalexin [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2015, 26(2): 282-292
- [19] Pedrozaroldan C, Charlesni O C, Saavedra R, et al. Variable epitope library-based vaccines: shooting moving targets [J]. *Molecular Immunology*, 2009, 47(3): 270-282
- [20] Guo L, Wu X, Liu L, et al. Gold nanoparticle-based paper sensor for simultaneous detection of 11 benzimidazoles by one monoclonal antibody [J]. *Small*, 2017, 14(6): 170-172
- [21] Tsiaila Z, Ucles-Moreno A, Petrou P, Determination of chlorpyrifos, imazalil and thiabendazoles in water, wine and grape samples using enzyme-linked immunosorbent assays [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2015, 95(2): 1298-1299
- [22] Dapeng, Peng, Nenghui, et al. Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of albendazole 2-aminosulfone residues in animal tissues [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2016, 27(2): 273-287
- [23] 付云洁, 刘志国, 武玉香. 胶体金免疫层析法快速检测食品中金霉素残留 [J]. *食品科学*, 2010, 31(2): 191-194
FU Yun-jie, LIU Zhi-guo, WU Yu-xiang. Development of a one-step immunochromatographic strip test for rapid detection of chlortetracycline residue in food [J]. *Food Science*, 2010, 31(2): 191-194
- [24] Pattarawarapan M, Nangola S, Cressey T R, et al. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS [J]. *Talanta*, 2007, 71(1): 462-470
- [25] Song S, Liu N, Zhao Z, et al. Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(10): 4995-5001