

酶联免疫吸附法测定水产品中甲基睾酮残留

王强, 王旭峰, 黄珂, 柯常亮, 杨金兰, 黎智广, 李刘冬

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业部水产品加工重点实验室, 农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 广东广州 510300)

摘要: 建立了测定水产品中甲基睾酮(MT)残留的间接竞争酶联免疫吸附法(icELISA)。采用琥珀酸酐法衍生化制备半抗原 MT17, 进一步偶联钥孔血蓝蛋白(KLH)制备免疫原 MT17-KLH, 经动物免疫成功获取特异性识别 MT 的多克隆抗体(与其它结构类似物交叉反应小于 1%)。优化确立了 icELISA 最佳检测条件: 包被原浓度 100 $\mu\text{g/L}$, MT 多克隆抗体稀释度 $1/1.2 \times 10^5$, 抗体反应时间 40 min, 药物稀释液为 PBS, 水产样品经乙腈提取, N-丙基乙二胺吸附剂(PSA)分散固相萃取(DSPE)净化后用于 icELISA 测定。本方法的抑制中浓度 IC_{50} 为 3.48 $\mu\text{g/L}$, 检测线性范围为 0.77~13.06 $\mu\text{g/L}$ 。水产样品加标回收率为 81.02~103.19%, 相对标准偏差为 4.46%~13.14%, 测定结果与液相色谱-质谱联用法具有良好的相关性 ($R=0.9971$)。本方法可用于水产品中甲基睾酮残留的快速测定。

关键词: 甲基睾酮; 酶联免疫吸附法; 分散固相萃取; 水产品

文章编号: 1673-9078(2015)5-303-308

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.048

Determination of Methyltestosterone Residue in Aquatic Products by Enzyme-linked Immunosorbent Assay

WANG Qiang, WANG Xu-feng, HUANG Ke, KE Chang-liang, YANG Jin-lan, LI Zhi-guang, LI Liu-dong

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture, Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510300, China)

Abstract: An indirect, competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) was developed for rapid determination of residual methyltestosterone (MT) in aquatic products. MT was reacted with succinic anhydride to obtain the hapten MT17, which was then coupled to keyhole limpet hemocyanin (KLH) as an immunogen (MT17-KLH). After animal immunization, the polyclonal antibody was successfully obtained and could specifically recognize MT (cross-reactivity with other structurally related chemicals was $< 1\%$). The optimized assay conditions for icELISA were as follows: coating antigen concentration at 100 $\mu\text{g/L}$; dilution ratio of MT polyclonal antibody at $1:1.2 \times 10^5$; 40 min reaction time of antibody; phosphate-buffered saline (PBS) as dilution solution; extraction of aquatic product with acetonitrile, followed by purification by dispersive solid-phase extraction (DSPE) using ethylenediamine-N-propyl (PSA)-bonded sorbent. The half inhibition concentration (IC_{50}) was 3.48 $\mu\text{g/L}$, while the linear range (IC_{20} ~ IC_{80}) was 0.77 to 13.06 $\mu\text{g/L}$. Recoveries from spiked aquatic products were in the range of 81.02% to 103.19%, with relative standard deviation ranging from 4.46% to 13.14%. The results showed good correlation with liquid chromatography-tandem mass spectrometry ($R = 0.9971$). The method developed in this study is suitable for rapid determination of methyltestosterone residues in aquatic products.

Key words: methyltestosterone; enzyme-linked immunosorbent assay; dispersive solid phase extraction; aquatic product

甲基睾酮 (Methyltestosterone, MT), 是一种人

收稿日期: 2014-08-22

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估重大专项 (GJFP2014009); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2013TS08, 2014TS09, 2015TS17); 广东省食品质量安全重点实验室开放课题基金 (KLFQS201202)

作者简介: 王强 (1988-), 男, 助理研究员, 研究方向: 渔业环境及水产品质量与安全

通讯作者: 李刘冬 (1959-), 男, 研究员, 研究方向: 渔业环境及水产品质量与安全

工合成的类固醇激素, 具有增强雄性体性特征和促生长等作用。在水产养殖行业中为提高鱼体成活率高和增加产量, 常在鱼苗培育过程中通过在鱼饲料或其它投入品掺入一定量的 MT, 实现鱼体的雄性化, 达到单性养殖生产的目的^[1]。研究表明, MT 在水产动物体内的代谢缓慢, 痕量的残留可能会扰乱人体内激素平衡, 导致肝中毒或其它重要组织器官发生生理病变, 甚至具有潜在致癌作用^[2]。因此, 欧美等多个国家将其列为水产养殖中的禁用药物, 我国农业部在 2002 年颁布的

235号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》将其列为兽药残留的重要检测对象,规定在动物性食品的可食组织中不得检出MT^[3]。

目前,检测MT主要有高效液相色谱法(HPLC)^[4],液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)^[5]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[6]和免疫分析法(IA)^[7-8]等。其中仪器方法准确、灵敏,但分析时间长,设备相对昂贵,不适用于现场快速筛选及检测。而免疫分析法,特别是基于抗原抗体反应的酶联免疫吸附法(ELISA)具有特异性强、灵敏、简便、准确和样品通量高等优点,非常适于现场快速检测,不过现有关于甲基睾酮的ELISA多以血液、尿液或毛发等为检测对象,针对养殖水产品中MT残留量测定的研究甚少。本研究在成功制备甲基睾酮半抗原和特异性抗体基础上,优化确定ELISA各项检测条件,同时结合分散固相萃取技术消除水产样品中的基质干扰。本方法操作简单、快速、灵敏度高,测定结果和液相色谱-质谱联用法呈现良好的相关性,为快速测定水产品中痕量残留的甲基睾酮提供一种有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲基睾酮、睾酮、勃地龙、丙酸诺龙、群伯龙、19-诺龙、司坦唑和丙酸睾酮(纯度≥95.5%),德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清蛋白(BSA)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、Freund 完全与不完全佐剂,美国 Sigma 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,武汉博士德生物工程有限公司;PSA、十八烷基键合硅胶吸附剂(C₁₈)和石墨化碳黑(GCB),德国 CNW 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

API3000 三重四级杆液质联用仪,美国 Applied Biosystems 公司;DRX-600 核磁共振仪,德国 Bruker 公司;VersaMax 酶标仪和 MultiWash III 洗板机,美国 Molecular Devices 公司;R210 型旋转蒸发仪,瑞士 BUCHI 公司;Biofuge Stratos 台式高速冷冻离心机,美国 Thermo 公司;U-3900 紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 半抗原的合成

琥珀酸酐衍生法^[9]制备半抗原,将 1 mmol MT 和

4 mmol 琥珀酸酐溶解于 10 mL 吡啶溶液中,室温避光反应 12 h,反应物浓缩后加入 20 mL 的 1 mol/L NaOH,乙酸乙酯萃取 3 次,将水相冷却后用 2 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 3.0 左右,再次用乙酸乙酯萃取,有机相蒸干柱层析纯化得 0.25 g 目标物 MT17,产率 36% (图 1)。ESI-MS (positive) m/z: 403.5 [M-H]⁺; ¹H NMR (600 MHz, Methol-d₄) δ5.73 (s, 1H), 2.77 (s, 2H), 2.54 (m, 2H), 2.32 (m, 2H), 1.92 (m, 2H), 1.71 (m, 2H), 1.53 (dd, J=12.6, 3.5Hz, 3H), 1.46 (m, 2H), 1.42~1.45 (m, 3H), 1.38~1.40 (m, 4H), 1.37 (dd, J=12.2, 6.9Hz, 3H), 1.23~1.30 (m, 4H), 1.06 (dd, J=13.6, 3.1 Hz, 3H)。

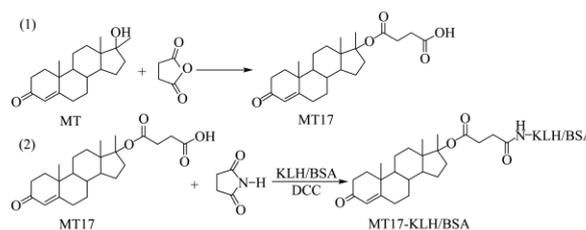


图1 半抗原 MT17 和人工抗原 MT17-KLH/BSA 的合成路线

Fig.1 Synthetic derivation of haptent MT17 (1) and artificial antigen (2) MT17-KLH/BSA

1.3.2 人工抗原制备及鉴定

采用活泼酯法^[10]将半抗原 MT17 与载体蛋白 KLH 和 BSA 偶联,反应液置于 0.9% NaCl 溶液中,4 °C 下透析 72 h,分别制备免疫原 MT17-KLH 和包被原 MT17-BSA (图 1),偶联物采用紫外扫描光谱进行鉴定,按文献^[11]的方法计算抗原偶联比。

1.3.3 动物免疫

用 MT17-KLH (1 g/L) 免疫新西兰大白兔,每次免疫剂量 500 μg (按 KLH 量计算),每隔 3 周加强免疫一次,第 5 次免疫 9 d 后心脏取全血,血清经辛酸-硫酸铵法纯化,-20 °C 保存。

1.3.4 MT 间接竞争酶联免疫分析(icELISA)

将 MT 标准物用缓冲液配制成系列浓度的标准工作液,优化确定 icELISA 包被原浓度、抗体稀释度、抗体反应时间和药物稀释液等反应条件。采用 OriginPro 8.0 软件四参数对数函数进行数据分析,绘制竞争标准曲线,其中横坐标为 MT 标准液浓度的对数值,纵坐标为 B/B₀ (B 为添加竞争药物时的吸光值,B₀ 为不添加药物时的吸光值),计算获得 icELISA 的最低检测限 (LOD),抑制中浓度 (IC₅₀)、线性检测范围等参数^[12]。

1.3.5 特异性分析

选用 MT 结构类似药物进行 icELISA 测定,以交叉反应率 (CR) 评价方法的特异性,结果按式 (1)

计算:

$$CR/\% = [IC_{50}(MT) / IC_{50}(\text{其他药物})] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6 样品提取与净化

鱼虾类样品取可食肌肉部分, 均质处理成肉糜状的待测试样。提取: 称取试样 5.0 g 于 50 mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 20 mL 乙腈, 均质处理 1 min, 加入 10.0 g 无水 Na_2SO_4 漩涡混合 2 min, 超声波提取 10 min, 4000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, 重复提取一次。净化: 上清液减压蒸干, 加入 2 mL 50% 甲醇-PBS 溶液复溶, 取 1 mL 复溶液转入装有 40 mg PSA 的离心管中, 充分漩涡震荡 2 min, 10000 r/min 离心 5 min 后吸取上清液测定。

1.3.7 液相色谱-串联质谱分析

液相色谱条件: Waters C_{18} 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL ; 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 80%~10% A; 3~5 min, 10% A; 5~6 min, 10%~80% A; 6~10 min, 80% A。

质谱条件: 电喷雾电离正离子模式; 喷雾电压: 5000 V; 雾化气: 5 L/min; 气帘气: 8 L/min; 离子源温度: 500 $^{\circ}\text{C}$; 驻留时间: 100 ms; 母离子: 303.2; 子离子: 97.1 (定量)/109.1 (定性)。

2 结果与讨论

2.1 MT 抗原的合成与鉴定

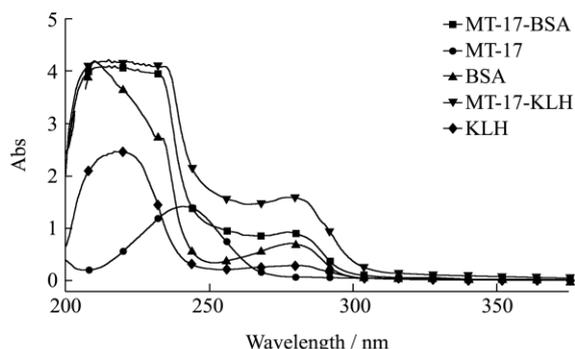


图2 人工抗原紫外吸收曲线

Fig.2 Ultraviolet spectra of the artificial antigen

建立用于农兽药残留检测的免疫分析法, 抗原的制备是一项关键的影响因素^[13]。甲基睾酮分子上 C-3 位置的羰基和 C-17 位置的甲基均是主要的抗原决定簇, 本研究采用琥珀酸酐法对 MT 分子 C-17 位置的羟基衍生化, 在最大程度的模拟 MT 母体分子的基础上, 获得含四个碳原子手臂结构的羧基活性基团, 满

足半抗原设计的基本要求, 经质谱与核磁共振波谱鉴定, 分析数据归属正确, 符合目标物 MT17 的结构。进一步采用活泼酯法将半抗原与载体蛋白共价结合制备人工抗原, 选取具有更好免疫应答效果的 MT17-KLH 作为免疫原。紫外扫描鉴定 (图 2) 显示, MT17 的特征吸收峰在 241 nm, KLH 和 BSA 的特征吸收峰均为 278 nm, 而相比于载体蛋白, 偶联物在 235~255 nm 波长范围也具有紫外吸收特征, 呈现出半抗原与载体蛋白吸收峰叠加的特征, 表明人工抗原偶联成功, MT17-KLH 和 MT17-BSA 偶联比分别为 18:1 和 13:1。

2.2 icELISA 检测条件的优化

通过单因素实验测定包被原浓度、抗体稀释度、抗体反应时间和药物稀释液对 icELISA 检测灵敏度的影响, A_{max}/IC_{50} 值越大检测灵敏度越高, 其中 A_{max} 为对应曲线的最大吸光值。本研究确定的最佳 icELISA 检测条件 (图 3): 包被原浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, 抗体稀释度为 $1/1.2 \times 10^5$, 抗体反应时间为 40 min, 药物稀释液为 PBS 缓冲液。

2.3 标准曲线的建立

基于上述的最佳检测条件, 建立了甲基睾酮 icELISA 标准曲线 (图 4), IC_{50} 为 3.48 $\mu\text{g/L}$, 最低检测限为 0.31 $\mu\text{g/L}$, 定量检测线性范围为 0.77~13.06 $\mu\text{g/L}$, 满足 GB/T 21981-2008 和 SC/T 3029-2006 的相关检测要求。

2.4 特异性分析

表 1 交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity

交叉反应物	$IC_{50}/(\mu\text{g/L})$	CR/%
甲基睾酮	3.48	100
睾酮	356.32	0.98
勃地龙	450.93	0.77
丙酸诺龙	1690.79	0.21
群伯龙	2834.01	0.12
19-诺龙	>3500	<0.1
丙酸睾酮	>3500	<0.1
司坦唑	>3500	<0.1

特异性分析选用了 8 种结构类似的雄性激素类药物, 测定其相应的交叉反应率 (CR), 交叉反应率越低, 特异性越强。结果显示 (表 1), 针对 19-诺龙、丙酸睾酮和司坦唑几乎没有交叉反应 ($CR < 0.1\%$), 而针对睾酮、勃地龙、丙酸诺龙和群伯龙有微弱的交叉反应

(CR<1%), 但不影响对监测结果的判定, 针对 MT 特异性良好。

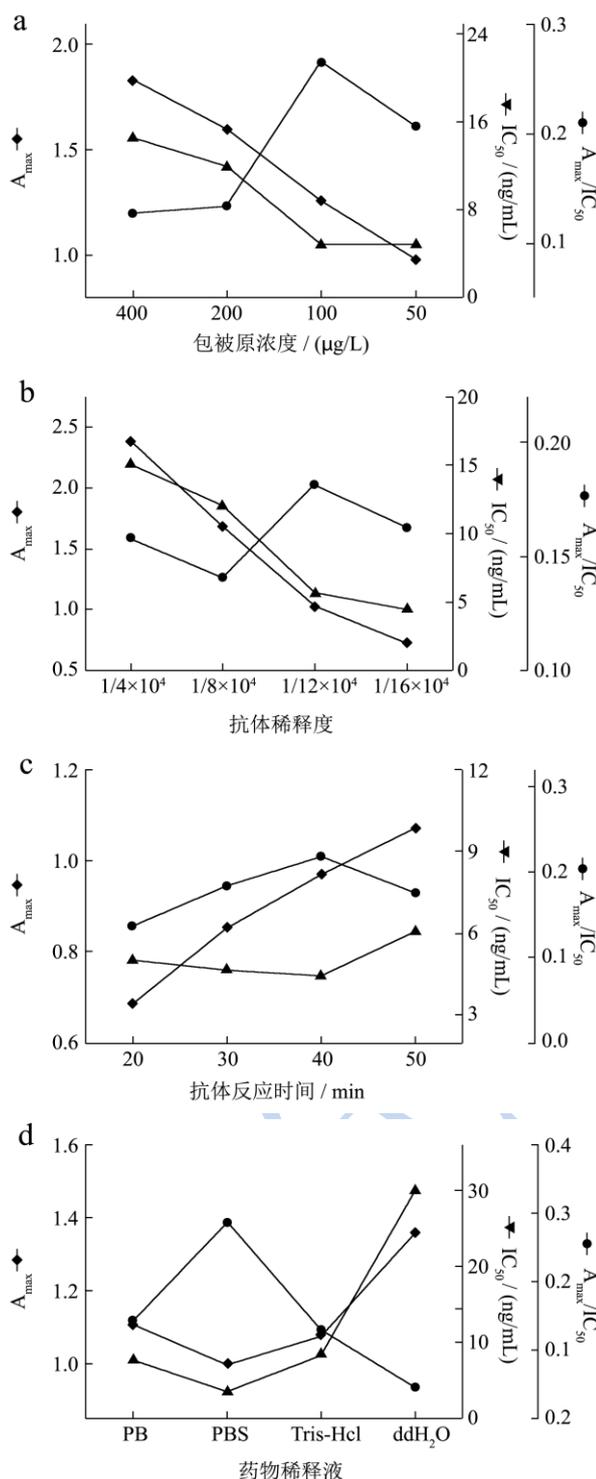


图3 不同工作条件对 icELISA 灵敏度的影响

Fig.3 Influence of different conditions on the sensitivity of icELISA

注: 图 a 包被原浓度依次为 400、200、100、50 μg/L; 图 b 抗体稀释度依次为 1/4×10⁴、1/8×10⁴、1/12×10⁴、1/16×10⁴; 图 c 抗体反应时间依次为 20、30、40、50 min; 图 d 药物稀释液中 PB、PBS、Tris-HCl 均为 pH7.4, 0.01 mol/L。

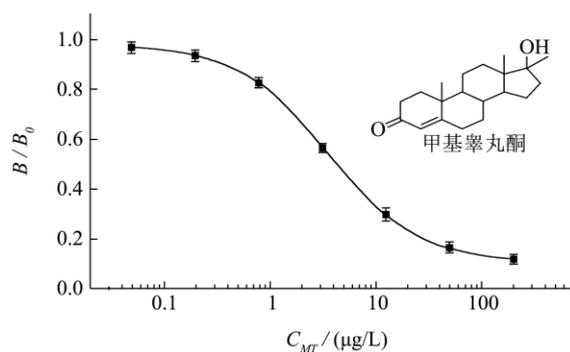


图4 甲基睾酮 icELISA 标准曲线

Fig.4 icELISA standard curve for methyltestosterone

2.5 样品前处理方法的优化

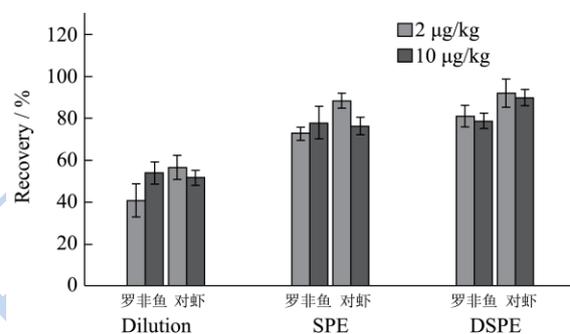


图5 不同净化方式对回收率的影响

Fig.5 Influence of different purification methods on recovery

免疫分析法的准确度和灵敏度容易受到样品基质中不同组分的干扰, 如蛋白质、脂肪酸和色素等。为消除样品基质的干扰, 本试验选用罗非鱼和对虾样品, 比较三种不同净化处理方式对 icELISA 检测结果的影响: (1) 稀释处理 (Dilution), 样品经乙腈提取后, 提取液减压蒸干复溶, 用 PBS 缓冲液 20 倍稀释处理后用于 icELISA 检测, 结果样品整体回收率不超过 60%, 可能的原因是由于样品基质干扰, 导致 A_{max} 值降低, 经样品空白扣除后, 实测值降低, 样品提取后直接稀释处理无法有效消除基质干扰影响; (2) 固相萃取 (SPE), 样品提取后的复溶液体加入到已提前活化处理的 HLB SPE 柱子上, 经 3 mL 水和 3 mL 10% 甲醇淋洗后, 用 5 mL 甲醇洗脱, 氮气吹干, 缓冲液复溶后测定, 结果显示测定样品对 A_{max} 值影响不大, 回收率为 72.67%~88.41%, 但操作过程相对繁琐冗长; (3) 分散固相萃取 (DSPE), 试验比较选取了 PSA、C₁₈ 和 GCB 散三种常用的 DSPE 吸附剂, 其中 C₁₈ 和 GCB 于针对目标物 MT 具有强烈的吸附作用, 而 PSA 的吸附作用较弱且可以消除样品中脂肪酸、有机酸和色素等杂质的干扰。样品提取后转移至含有 PSA 的离

心管中, 漩涡震荡后高速离心处理, 上层液体用于 icELISA 检测, 整体回收率大于 80%, 方法简便、快速、高效, 可以满足定量检测的要求。

2.6 方法准确度和精密度

向罗非鱼、鲫鱼、甲鱼和对虾四种空白的样品中分别添加1、5和10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个水平的MT药物标准液, 按照方法2.2.6处理法进行分析, 每个浓度水平做3次平行试验(表2), 加标回收率为81.02~103.19%, 相对标准偏差(RSD)为4.46%~13.14%。为进一步确定所建立方法的准确度, 选取罗非鱼和对虾加标样品进行 LC-MS/MS 比对测定, 流动相配制0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.01 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.005 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和0.001 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的MT标准工作液, MT 保留时间为 7.69 min, 线性回归方程为 $y = 2.90 \times 10^3 x + 4.23 \times 10^3$, 相关系数 $R = 0.9997$ 。将 icELISA 测定值作为x轴, LC-MS/MS 测定值作为y轴, 两种方法测定结果拟合后线性回归方程为 $y = 1.08x - 0.06$, 相关系数 $R = 0.9971$ 。结果表明, 本方法准确度高、精密度好。

表 2 4 种水产品的添加回收测定

Table 2 Recoveries of four spiked aquatic products

样品	添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%
罗非鱼	1	0.88	88.45	11.66
	5	4.13	82.58	7.87
	10	9.30	92.98	9.09
鲫鱼	1	0.82	82.17	7.18
	5	4.77	95.43	7.04
	10	8.10	81.02	9.20
甲鱼	2	1.03	103.19	13.14
	5	4.31	86.13	6.40
	10	8.93	89.33	5.93
对虾	1	0.84	84.39	7.17
	5	4.61	92.30	4.46
	10	9.47	94.73	8.47

3 结论

3.1 近年来, 我国不断加快推进水产品市场准入制度, 而高通量的免疫快速检测技术为保障我国水产品质量安全提供一种有效的技术手段。相比于其它基于抗原抗体反应免疫分析法, ELISA 检测灵敏度高、方法简单、配套技术成熟, 可以满足现有痕量检测技术的要求, 目前商业化应用和推广程度较高。例如, 美国 Reagen 公司销售的甲基睾酮 ELISA 试剂盒针对动物源性食品样品的最低检测限达到 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率大

于 80%, 而 Lu 等^[8]购买了英国 Biogenesis 公司生产的 MT 兔多克隆抗体, 建立了测定牛尿液中 MT 残留的 ELISA, 方法最低检测限为 0.27 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

3.2 本研究采用琥珀酸酐衍生法制备了 MT 半抗原, 免疫动物获取了高特异性的多克隆抗体。单因素试验比较分析了包被原浓度、抗体稀释度、抗体反应时间和药物稀释液等因素对 icELISA 检测灵敏度的影响。探讨了消除水产品基质干扰的样品处理方法, 结果表明样品提取后采用 PSA 分散固相萃取处理可获得稳定的回收率, 并且不会影响检测灵敏度。所建立的 icELISA, 最低检测限为 0.31 $\mu\text{g}/\text{L}$, 同国外商业化的试剂盒或抗体的灵敏度相当。水产样品加标回收率为 81.02~103.19%, RSD 为 4.46%~13.14%, 与 LC-MS/MS 具有良好的相关性, 检测结果准确可靠, 操作简单、灵敏度高, 适用于水产品中 MT 残留的快速检测, 为进一步自主开发快速、简便的 ELISA 试剂盒奠定基础。

参考文献

- [1] Rivero-Wendt C L, Miranda-Vilela A L, Ferreira M F, et al. Lack of genotoxicity in astyanax bimaculatus and oreochromis niloticus of 17alpha-methyltestosterone used in fish hatcheries to produce male monosex populations [J]. Genet. Mol. Res., 2013, 12(4): 5013-5022
- [2] Han Y, Ma Q, Lu J, et al. Optimisation for subcritical fluid extraction of 17-methyltestosterone with 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane for HPLC analysis [J]. Food Chem., 2012, 135(4): 2988-2993
- [3] 陈培基, 李刘冬, 邹琴, 等. 高效液相色谱法测定水产品中甲基睾酮残留量的优化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 223-226
CHEN Pei-ji, LI Liu-doong, ZOU Qin, et al. HPLC determination of 17 α -methyltestosterone residue in aquatic products [J]. Food Science, 2010, 31(6): 223-226
- [4] Homklin S, Ong S K, Limpiyakorn T. Biotransformation of 17alpha-methyltestosterone in sediment under different electron acceptor conditions [J]. Chemosphere, 2011, 82(10): 1401-1407
- [5] Regal P, Nebot C, Vazquez B I, et al. Determination of the hormonal growth promoter 17alpha-methyltestosterone in food-producing animals: bovine hair analysis by HPLC-MS/MS [J]. Meat Sci., 2010, 84(1): 196-201
- [6] McKinney A R, Suann C J, Stenhouse A M. A stereochemical examination of the equine metabolism of 17alpha-methyltestosterone [J]. Anal. Chim. Acta., 2007, 581(2): 377-387

- [7] van Peteghem C, van Look L, De Guesquiere A. Chemiluminescence immunoassay for the detection and quantification of methyltestosterone residues in muscle tissue [J]. *J. Chromatogr.*, 1989, 489(1): 219-223
- [8] Lu H, Conneely G, Crowe M A, et al. Screening for testosterone, methyltestosterone, 19-nortestosterone residues and their metabolites in bovine urine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 570(1): 116-123
- [9] 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 [J]. *Talanta*, 2011, 83(3): 732-737
- [10] Xu Z L, Shen Y D, Zheng W X, et al. Broad-specificity immunoassay for O, O-diethyl organophosphorus pesticides: application of molecular modeling to improve assay sensitivity and study antibody recognition [J]. *Anal. Chem.*, 2010, 82(22): 9314-9321
- [11] 郭杰标,郝卿辰,李杏娉,等.保健酒中萘普生免疫学检测方法的建立[J].*现代食品科技*,2013,28(8):2011-2014
GUO Jie-biao, HAO Ji-chen, LI Xing-ping, et al. Development of an immunoassay for detection of naproxen in health liquor [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 28(8): 2011-2014
- [12] Lei H, Shen Y, Song L, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 665(1): 84-90
- [13] Le T, Zhao Z, Wei W, et al. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg [J]. *Food Chem.*, 2012, 134(4): 2442-2446