

动物源食品中孕酮激素残留的时间分辨荧光免疫分析法的建立

刘波¹, 华彦涛¹, 马楠楠², 赵炫¹, 陈丽楠¹, 袁利鹏^{1*}

(1. 广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广东广州 511365)

(2. 广州万联生物科技有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 该研究以孕酮为研究对象, 设计并制备了新抗原, 通过动物免疫得到特异性兔抗体, 基于所得抗原和抗体, 进一步优化了抗原抗体浓度、反应缓冲液种类及其 pH 值等关键参数, 最终在国内首次建立了用于动物性食品中性激素孕酮残留快速检测时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA)。该研究确定最优实验条件为: 抗原 0.30 $\mu\text{g/mL}$ 、辅标抗体 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 、pH 值 7.2 的 TBST 工作缓冲液, 并建立标准曲线, 方法的线性范围为 0.46~6.94 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 达 1.79 $\mu\text{g/L}$, 与睾酮交叉反应率为 1.25%, 与雌二醇、雌三醇等激素无交叉反应。实际样品的平均添加回收率为 82.0%~113.0%, 批内批间变异系数 < 5%, 与高效液相色谱法 (HPLC) 检测结果的相关性良好 ($r^2=0.988$)。结果表明该研究所建立的 TRFIA 检测方法准确可靠、特异性好、灵敏度高, 完全可用于动物源食品中孕酮残留的快速检测。

关键词: 动物性食品; 孕酮; 抗体; 时间分辨荧光免疫分析; 检测

文章编号: 1673-9078(2024)06-279-284

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.6.0672

Establishment of Time-resolved Fluorescence Immunoassay for Progesterone Residues in Animal-derived Foods

LIU Bo¹, HUA Yantao¹, MA Nannan², ZHAO Xuan¹, CHEN Li'nan¹, YUAN Lipeng^{1*}

(1. Guangdong Aib Polytechnic, Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Guangzhou 511365, China)

(2. Guangzhou Wanlian Biotechnology Co. Ltd., Guangzhou 510663, China)

Abstract: In this study, progesterone was taken as the research object, a new antigen was designed and prepared, and specific rabbit antibody was obtained through animal immunization. Based on the obtained antigen and antibody, key parameters, such as the concentration of antigen and antibody, the type of reaction buffer and its pH value, were further optimized. Finally, a time-resolved fluorescence Immunoassay (TRFIA) for rapid detection of progesterone residues in animal-derived foods was established for the first time in China. In this study, the optimal experimental conditions were

引文格式:

刘波, 华彦涛, 马楠楠, 等. 动物源食品中孕酮激素残留的时间分辨荧光免疫分析法的建立[J]. 现代食品科技, 2024, 40(6):279-284.

LIU Bo, HUA Yantao, MA Nannan, et al. Establishment of time-resolved fluorescence immunoassay for progesterone residues in animal-derived foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(6): 279-284.

收稿日期: 2023-06-05

基金项目: 广东省教育厅工程技术研究中心项目 (2019GGCZX010); 广东省教育厅高职领军人才项目 (食品加工技术专业)[20181423]; 广州市增城高层次人才项目[人才办 201807]; 广东省普通高校青年创新人才类项目 (2022KQNCX211); 广东省攀登计划项目 (pdjh2022b0914); 广东农工商职业技术学院重点项目 (xyzd1606)

作者简介: 刘波 (1980-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向: 农产品安全、食品贮藏, E-mail: 471270952@qq.com

通讯作者: 袁利鹏 (1979-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 农产品, 食品快速检测与综合加工利用, E-mail: 543753927@qq.com

determined as follows: the concentration of antigen was 0.30 $\mu\text{g/mL}$, the concentration of europium labeled antibody was 0.40 $\mu\text{g/mL}$, the pH of TBST working buffer was 7.2, and the standard curve was established. The linear range of the method was 0.46~6.94 $\mu\text{g/L}$, the IC50 reached 1.79 $\mu\text{g/L}$, the cross-reaction rate with testosterone was 1.25%, and there was no cross-reaction with estradiol, estriol and other hormones. The average spiking recovery rate of the actual samples was 82.0%~113.0%, and the coefficient of variation within and between batches was less than 5%. The correlation with the analysis results obtained by high-performance liquid chromatography was good ($r^2 = 0.988$). The results indicate that the TRFIA detection method established in this study was accurate, reliable, specific, and sensitive, and can be used for the rapid detection of progesterone residues in animal-derived foods.

Key words: animal-organ foods; progesterone; antibody; time-resolved fluorescence immunoassay; detection

孕酮是一种由动物体性腺所产生或由人工合成的分子质量低、亲脂性、具有生物活性的类固醇类性激素。为了达到提高饲料利用率、快速生长和性转变等目的,此类性激素被非法用于动物饲养过程中。由于难以代谢出体外,残留在动物体内的性激素可通过食物链进入人体,刺激或抑制人体内源性激素的正常作用,进一步改变神经、免疫和内分泌系统的正常调控功能,从而引发肥胖、变态、神经行为异常和儿童性早熟等诸多问题^[1]。

目前,欧盟已严格禁止性激素在动物饲养方面的使用^[2],我国农业部 235 号公告中明确规定,部分性激素在动物源性食品中不得检出^[3]。孕酮类激素已建立的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[4]、液相色谱-质谱联用(HPLC-MS或LC-MS/MS)^[5-9]、胶体金层析卡^[10]、电化学传感器^[11]和分子印迹传感器^[12]等。精密仪器分析方法具有准确度高、精密度好及灵敏度高等特点,但是存在分析成本高、前处理耗时长、需要配备专业技术人员等问题,难以满足我国动物性食品高通量的检测需求^[13-15]。免疫快速分析方法在食品安全与医学检测中应用广泛,具有灵敏快速、便捷成本低、通量高及可现场检测等优点^[16,17]。基于免疫反应的高特异性和标记反应物的高灵敏度所建立的时间分辨荧光免疫分析法(Time-resolved Fluorescence Immunoassay, TRFIA)除了具备传统的酶联免疫吸附法(Enzyme-linked Immune-sorbent Assay, ELISA)的通量高、检测快的优点外^[18-20],还具有重复性好、标准曲线范围宽和应用范围广泛等优势,该技术深受行业关注^[21-23]。

本研究拟设计并制备新型抗原和其特异性兔抗体,优化抗原抗体稀释倍数、钆标抗体浓度、反应缓冲液和其 pH 值等关键方法条件,旨建立测定动物样品中孕酮残留的孕酮时间分辨荧光免疫分析方

法,通过线性、准确度、精密性和添加回收实验,对检测方法进行评价,最后与高精度的高效液相色谱(HPLC)相比对。时间分辨免疫分析法重复性好、灵敏度高,本方法的成功建立可协助市场监管部门有效监管动物性食品中孕酮类激素的非法滥用现象,进一步确保人民大众的食品安全。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛奶、牛肉样品均购自市场;稀释液和包被液,广州万联生物科技有限公司;钆标记物(DTBTA-Eu³⁺),广州达瑞生物技术股份有限公司;96 微孔板,深圳金灿华实业有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF),二甲基亚砜(DMSO)、乙酸乙酯、甲醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾,氯化钠、盐酸和氢氧化钠等化学试剂(分析纯),广东广试试剂科技有限公司;孕酮、睾酮、雌二醇、雌三醇、1,3-丙二胺、吐温(Tween-20)、Tris-HCl,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA),弗氏佐剂完全佐剂和不完全佐剂,美国 sigma 公司。

1.2 仪器与设备

HPLC 液相色谱仪,日本岛津;5417R 高速离心机,德国 Eppendorf 公司;氮吹仪,康宁科技有限公司;DR-M 6601 时间分辨荧光分析仪,广州达瑞生物技术股份有限公司;Well wash MK2 洗板机,美国 Thermo 公司;微量移液器,德国 Eppendorf 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 人工抗原制备

合理的半抗原结构设计是制备高特异性抗体原

料的关键, 相关文献^[10,11]均是直接将孕酮连接 BSA 等蛋白载体作为抗原, 获得的抗体特异性不足, 与类似睾酮等性激素交叉反应率较高。本研究在保留原有孕酮结构的基础上, 延长 6~7 个碳链手臂, 尽可能减少载体蛋白空间位阻效应, 以便于获得孕酮高特异性抗体, 降低药物交叉反应。具体制备流程如下: 将含有 0.5 mL 1,3- 丙二胺和 0.5 mL 吡啶的 10 mL 二甲基亚砜 (DMSO) 缓慢滴加到溶有 1.0 g 孕酮 5 mL (DMSO) 中, 40 °C 油浴反应 12 h, 旋蒸除去溶剂和未反应的丙二胺, 定量得到中间产物^[24]。再称取 100 mg 中间产物 A 和 30 mg 丁二酸酐溶于 5 mL 无水吡啶中, 95 °C 油浴反应 1.5 h, 旋转蒸发烘干后得到半抗原 P-Hapten。采用活泼酯法, 将半抗原分别偶联牛血清蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 后, 作为免疫抗原 P-Hapten-BSA 和包被抗原 P-Hapten-OVA。结果如图 1 所示, 半抗原、蛋白经紫外扫描鉴定, 峰型发生改变, 说明抗原偶联制备成功。

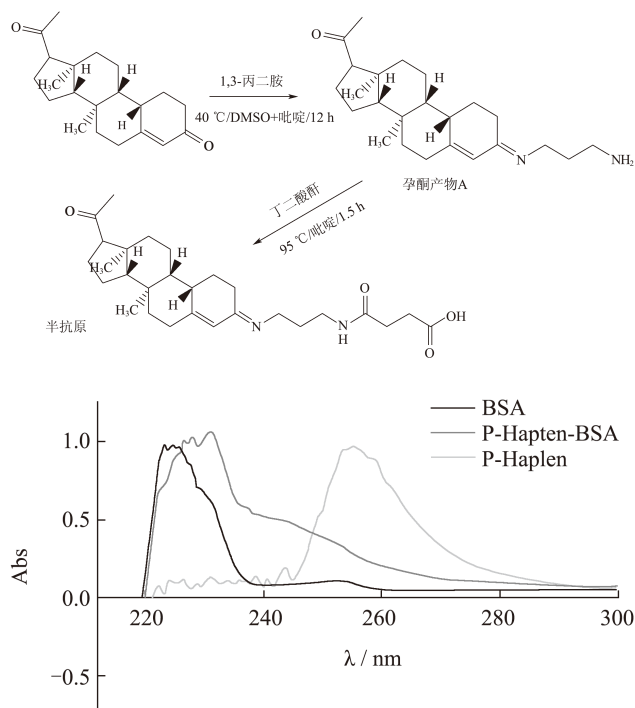


图 1 孕酮半抗原合成路线及紫外鉴定扫描图

Fig.1 Synthetic route and UV identification of progesterone hapten

1.3.2 抗体制备

用所制备的免疫原 P-BSA 对 8~9 周龄的新西兰大白兔多次免疫, 制备兔多抗。首次免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂乳化, 对背部皮下进行免疫。免疫的时间间隔分别为 4/3/3 周, 将抗原与弗氏不完

全佐剂乳化, 加强免疫 3 次后, 对其耳部采血, 利用间接酶联免疫吸附法 (ic-ELISA) 检测其血清效价, 四免后效价和药物抑制率如图表 1 所示, 兔 1 的效价为 252 k, 1 μg/mL 孕酮抑制率为 92.5%, 效果最好。免疫完成后对颈部采血, 再离心后取上清, 最后用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化所得抗体。

表 1 抗血清效价抑制率的测定

Table 1 Determination of titer inhibition rate of antiserum

抗血清	效价	抑制率/%			
		孕酮	睾酮	雌二醇	雌三醇
兔 1	252 k	92.5	5.6	ND	ND
兔 2	126 k	81.3	4.7	ND	ND

注: 药物质量浓度 1 μg/mL, 包被原质量浓度 1 μg/mL; ND 无效果。

1.3.3 TRFIA 的实验步骤

(1) 包被: 包被液稀释孕酮包被抗原至合适浓度, 每孔加入 100 μL, 置于 37 °C 电热烘箱中过夜包被。(2) 封闭: 用洗涤液清洗包被板 2 次, 每孔加入封闭液 120 μL (1% BSA, *m/V*), 放置电热恒温箱中 37 °C 封闭 3 h 取出, 甩干孔中残留液体, 在 37 °C 烘箱中烘干, 再 4 °C 冷藏备用。(3) 反应: 在所制备好的板中每孔加入 50 μL 系列浓度标准溶液和 100 μL 稀释好的锚标抗体溶液, 并贴加盖膜片, 室温震荡孵育 1 h, 每孔加 300 μL 洗涤液, 洗涤 5 次。(4) 测定: 每孔加增强液 200 μL, 室温振荡反应 10 min, 用时间分辨荧光测定仪测定各孔荧光值。(5) 数据分析: 设置以孕酮药物的标准溶液浓度对数为横坐标, 荧光值的比值百分比 $B/B_0\%$ 为纵坐标, 采用 Origin 8.5 软件拟合竞争曲线, 并分析数据。

1.3.4 TRFIA 的条件优化

1.3.4.1 包被抗原与抗体的使用浓度

包被抗原与抗体的使用量对竞争反应影响大, 若过量则无法形成竞争反应, 且成本增加, 若不足量则对结果会造成误差。本研究将 1 mg/mL 的抗原与 1 mg/mL 的抗体分别稀释不同比例, 按照 1.3.1 实验步骤, 可计算标准曲线空白样品的荧光值 F_{max} 及 IC_{50} (引起 50% 抑制对应孕酮的浓度), 当 F_{max} 较高时表明体系信号值较强, IC_{50} 越低, 表明检测方法的灵敏度较好, 由此可确定出最优反应条件。

1.3.4.2 反应缓冲液及其 pH

缓冲溶液离子浓度、表面活性剂含量、pH 均会影响抗原抗体结合。以 PB (pH 值 7.0, 0.1 mol/L 磷

酸盐缓冲液)、PBS (0.1 mol/L 磷酸盐, 0.9% (m/V) NaCl)、PBST[0.1 mol/L 磷酸盐, 0.9% (m/V) NaCl, 0.05% (V/V) Tween 20]、TBST[0.02 mol/L Tris, 0.05% (V/V) Tween 20] 分别作为反应缓冲溶液,按照 1.3.1 实验步骤操作, 计算标准曲线的空白荧光值 F_{\max} 及 IC_{50} (引起 50% 抑制药物的浓度), 可确定最优反应条件。根据所确定的缓冲溶液, 再改变 pH 值, 按照上述流程最终确定最优 pH 值。

1.3.4.3 样品前处理

称取 5g 液体或粉碎后样品置于 50 mL 离心管中, 加入 2 g 无水硫酸钠和 10 mL 乙酸乙酯, 震荡提取 15 min 后, 4 000 r/min 离心 5 min。取 4 mL 上清, 40 °C 下氮气吹干, 加入 4 mL 溶液 ($\varphi=10\%$) 的甲醇 / 反应缓冲液) 复溶, 再将此溶液过 0.22 μm 滤膜过滤后进行检测。

1.3.5 特异性评价

用交叉反应率 (Cross-reactivity, CR) 来评价检测方法的特异性。利用时间分辨荧光免疫分析检测法测定孕酮、睾酮、雌二醇、雌三醇等各竞争物的半抑制浓度 (IC_{50} 值), 通过干扰药物与标准药物的 IC_{50} 的百分比来计算交叉反应率, 可对方法的特异性进行评价。

1.3.6 准确度实验

在市场购买若干牛肉、猪肉样本, 经 HPLC 确定为阴性后分别添加孕酮使其最终浓度为 1.0、2.5、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 按照检测方法前处理步骤和标准 GB/T 20753-2006 法分别进行处理, 用所建立的时间分辨荧光免疫分析法 (TRFIA) 和 HPLC 标准方法进行检测, 计算 TRFIA 与 HPLC 检测结果的相关性以评价该方法的准确度。

2 结果与分析

2.1 铕标抗体制备

取纯化后的抗体 0.5 mg 与铕标记物 (DTBTA- Eu^{3+}) 按照 1:20 的质量比在 pH 值 9.0 的碳酸盐缓冲液中, 避光震荡 2 h。再将标记后的溶液转移到 10 KD 的超滤管内, 离心, 去除未标记上的铕标记物。按 8 000 r/min 离心 5~6 min, 离心 4~5 次后, 收集浓缩液, 并用 TBST 溶液稀释成 1.0 mg/mL 备用。在后续条件优化实验中, 将铕标抗体稀释成不同浓度, 荧光值呈现梯度变化, 可判断出铕标抗体制备成功。

2.2 TRFIA 最优实验条件的确定

2.2.1 包被抗原与抗体的使用质量浓度

本参数优化以空白样品荧光值 F_{\max} 和半抑制质量浓度值 IC_{50} 作为评价影响因素的标准, IC_{50} 越小, 检测方法的灵敏度越高。选择 F_{\max} 适中、 IC_{50} 较低的稀释倍数作为最佳包被原和抗体的使用量。由图 2、图 3 看出, 在固定抗体质量浓度时, 随着包被原质量浓度增加, IC_{50} 先降低后升高, 空白样品的荧光值先升高后降低, 在包被原质量浓度为 0.30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 结果最优。同理, 在抗体质量浓度为 0.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, IC_{50} 与空白样品荧光值均达到最佳。

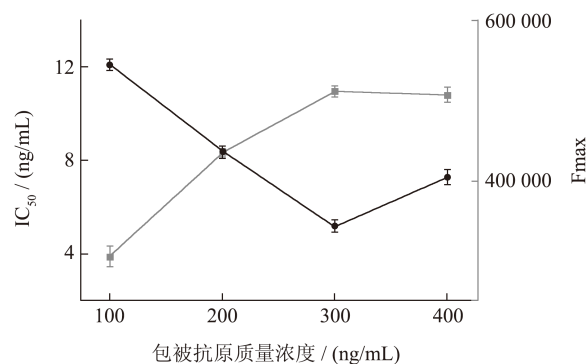


图 2 包被抗原使用质量浓度的优化

Fig.2 Optimization of concentration of coating antigen for TRFIA ($n=3$)

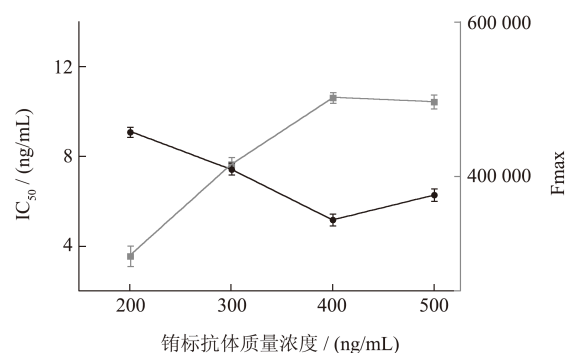


图 3 铕标抗体使用质量浓度的优化

Fig.3 Optimization of concentration of Eu^{3+} labeled antibody for TRFIA ($n=3$)

2.2.2 反应缓冲溶液及pH值

选择 F_{\max} 适中、 IC_{50} 较低的稀释倍数作为最佳反应缓冲液和缓冲液 pH 值。由图 4 可看出, 选用 TBST 作为反应缓冲液时, 方法的空白样品荧光值 F_{\max} 较高, IC_{50} 最低, 因此本方法选择 TBST 作为反应缓冲液。在此缓冲液基础上, 再调整 pH 值, 结果由图 5 可以看出, pH 值在 7.2 时效果较好, 因此本方法选择 pH 值 7.2 的 TBST 作为反应缓冲液。

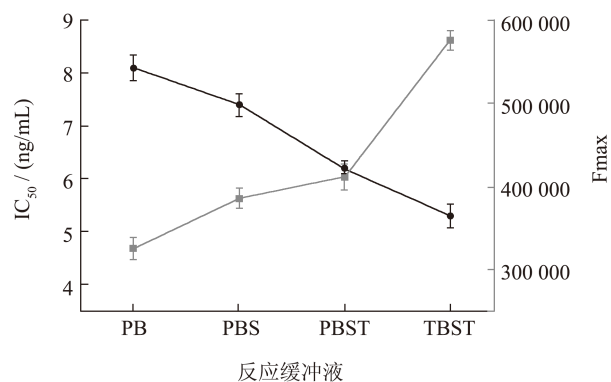


图4 反应缓冲液的优化

Fig.4 Optimization of reaction buffer for TRFIA (n=3)

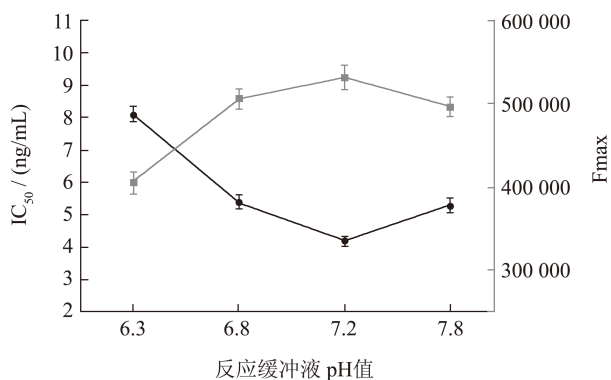


图5 反应缓冲液 pH 的优化

Fig.5 Optimization of pH of reaction buffer for TRFIA (n=3)

2.2.3 标准曲线的建立

按照上述确定的最优的包被抗原与钕标抗体浓度、反应缓冲液及 pH 等实验条件为前提，将孕酮标准品稀释成系列浓度，再进行实验。以标准品溶液浓度对数为横坐标 (X)，以荧光值比值百分比 B/B0% 为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，结果如图 6 所示。孕酮标准曲线的线性检测范围 (IC₂₀~IC₈₀) 为 0.46~6.94 μg/L，IC₅₀ 为 1.79 μg/L。

2.3 特异性评价

本方法的特异性结果如表 2 所示，除了与睾酮

交叉率 (Cross-reactivity, CR) 为 1.2% 外，与雌二醇、雌三醇等结构类似物或功能相似的性激素，其交叉反应率均低于 0.1%，表明所建立的 TRFIA 方法受其他化合物影响小，特异性良好。

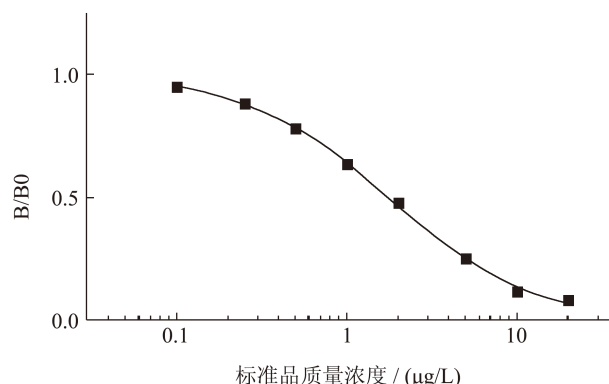


图6 TRFIA 检测孕酮的标准曲线

Fig.6 Standard curve for time-resolved fluorescence immunoassay of of progesterone

表 2 孕酮结构类似物或功能类似物的交叉反应结果
Table 2 Cross-reactivity of progesterone analogues determined by TRFIA

药物名称	IC ₅₀ /(μg/L)	CR/%
孕酮	1.79	100
睾酮	143.72	1.25
雌二醇	>1 000	<0.1
雌三醇	>1 000	<0.1

2.4 准确度结果

利用阴性的猪肉、牛肉做样品添加回收实验，结果如表 3、图 7 所示。TRFIA 方法的添加回收率在 73.0%~86.8% 之间，批内批间变异系数均小于 5%，其准确度、稳定性和精密度能达到检测要求，适用于动物性食品中孕酮的检测。通过与 HPLC 法的结果对比，其检测结果的相关性方程为 $y=1.040 2x+0.905$ ， r^2 为 0.987 7，表明 TRFIA 的检测结果准确可靠。

表 3 孕酮样品 TRFIA 和 HPLC 方法对比

Table 3 Comparison of TRFIA and HPLC methods for progesterone

样品	添加浓度 / (μg/kg)	TRFIA 测定				HPLC 测定		
		平均实测值 / (μg/kg)	平均回收率 / %	批内变异系数 (CV)/%	批间变异系数 (CV)/%	平均实测值 / (μg/kg)	平均回收率 / %	变异系数 (CV)/%
牛肉	1.0	1.13	113.0	4.5	4.7	0.91	91.0	3.6
	2.5	2.17	86.8	4.3	4.5	2.33	93.2	3.3
	5.0	4.52	90.4	3.2	3.6	4.49	89.8	2.9
猪肉	1.0	1.07	107.0	4.8	4.9	0.92	88.0	3.4
	2.5	2.05	82.0	3.6	3.9	2.27	90.8	3.3
	5.0	4.56	90.1	3.1	3.4	4.66	93.2	2.8

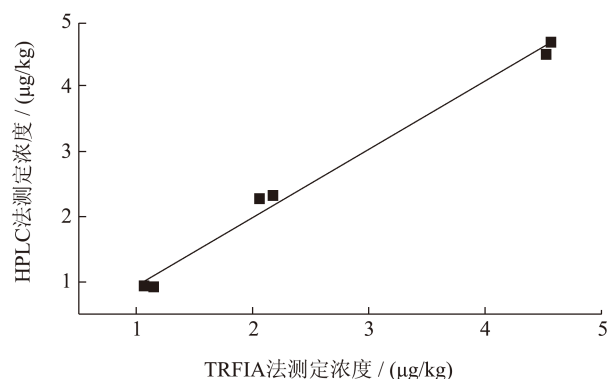


图7 孕酮样品 TRFIA 和 HPLC 方法对比

Fig.7 Comparison of TRFIA and HPLC methods for progesterone

3 结论

本研究基于所制备的人工抗原和对应特异性抗体,优化了抗原抗体稀释倍数、钼标抗体浓度、反应缓冲液和其 pH 值等关键方法条件,在国内首次成功建立了动物性食品中性激素孕酮残留的 TRFIA 检测方法。线性范围 0.46~6.94 μg/L, IC₅₀ 为 1.79 μg/L。检测方法与孕酮类似物的交叉反应较小,回收率在 73.0%~86.8%,批内批间差异 < 5%,且与 HPLC 结果相关性好 ($r^2=0.9877$),能满足动物性食品中孕酮检测要求。所建立的检测方法准确可靠、特异性好、灵敏度高、重复性高,搭配全自动时间分辨分析仪的条件下可实现自动化检测,具有较好的应用前景,本方法可有效监管动物性食品中孕酮类激素的非法滥用,能确保人民群众的食品安全。

参考文献

- [1] COHEN B K, SHORE L S, SHEMESH M, et al. Monitoring of natural and synthetic hormones in a polluted river [J]. Journal of Environmental Management, 2006, 78: 16-23.
- [2] 胡贝,李丽霞,刘红,等.化妆品中性激素的检测方法研究进展[J].日用化学工业,2020,50(9):629-636.
- [3] 农业部兽医局.中华人民共和国农业部公告第176号,第193号[EB/OL].(2007-09-19) http://www.moa.gov.cn/zwlmlm/zwdt/201104/t20110422_1976356.htm
- [4] 胡贝,李丽霞,吴茜,等.超高效液相色谱法测定液态水基类化妆品中22种性激素[J].日用化学工业,2021,51(4):363-368.
- [5] MALONE E M, ELLIOTT C T, KENNEDY D G, et al. Rapid confirmatory method for the determination of sixteen synthetic growth promoters and bisphenol A in bovine milk using dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2010, 878(15-16): 1077-1084.
- [6] YI Y, SHAO B, ZHANG J, et al. Analysis of eight free progestogens in eggs by matrix solid-phase dispersion extraction and very high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2011, 870(2): 241-246.
- [7] 王佳慧,杨帆,高明,等.液相色谱串联质谱检测鹿茸及其制品中孕酮等5种性激素[J].化学试剂,2020,42(9):1078-1082.
- [8] 李凯华,肖曼,张玲,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中多种雄性激素和孕激素[J].食品安全质量检测学报,2020,11(15):5068-5073.
- [9] 程永红,田莉虹.液相色谱串联质谱测定动物源性食品中孕激素类药物残留[J].食品与发酵科技,2021,57(2):161-164.
- [10] 艾霞,李天俊,李志源,等.奶牛孕酮免疫胶体金快速检测试纸条的研制[J].畜牧科学,2011,3:54-56.
- [11] 杨政,聂建华,刘振宇,等.奶牛孕酮浓度电化学检测方法[J].山西农业大学学报,2020,40(1):94-101.
- [12] 谭媛,韦天新,张力,等.孕酮分子印迹表面等离子共振传感器的制备[J].分析实验室,2021,40(5):588-592.
- [13] 崔廷婷,冯才伟,吴小胜,等.金刚烷胺残留化学发光酶免疫法的建立[J].食品工业科技,2019,40(14):275-279.
- [14] 许小炫,苏晓娜,谭庶,等.间接竞争化学发光酶联免疫分析方法检测禽肉中金刚烷胺和氯霉素残留[J].食品科学,2021,42(4):305-312.
- [15] 王序,卢迪莎,曾道平,等.时间分辨荧光免疫层析法定量检测谷物中黄曲霉毒素B₁和玉米赤霉烯酮残留[J].现代食品科技,2021,37(4):252-261.
- [16] 许晶晶,王兰腾,赖玉健,等.除草剂异丙甲草胺特异性抗体制备及免疫检测方法的建立[J].现代食品科技,2019,35(10):246-252.
- [17] 张燕,陈启镛,罗美芬,等.酶联免疫分析方法测定动物性食品中西马特罗残留[J].食品安全质量检测学报,2021,12(8):3090-3097.
- [18] 王文珺,王汝琦,刘磊,等.赭曲霉毒素A时间分辨荧光定量检测体系适用性评价[J].食品安全质量检测学报,2018,09(6):1344-1349.
- [19] 黄健欣.食品中泰乐菌素等几种药物残留的时间分辨荧光免疫层析检测方法研究[D].广州:华南农业大学,2020.
- [20] 赵维章,崔乃元,张汉青,等.时间分辨荧光免疫层析定量检测牦牛肉中喹诺酮类药物[J].食品工业科技,2020,41(18):239-243.
- [21] 宋亚宁,胡超琼,霍秋宇,等.基于核酸适配体识别-时间分辨荧光共振能量转移检测牛奶中培氟沙星兽药残留[J].食品与发酵工业,2021,47(7): 244-250.
- [22] 张小波,温国原,辛苗苗,等.米醇菌酸荧光定量检测卡的开发和应用[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3584-3589.
- [23] 谢婷婷.时间分辨荧光免疫层析法检测小麦中呕吐毒素的研究[J].粮食与食品工业,2018,25(3):61-63.
- [24] 魏泽怡,张加力.奶牛孕酮单克隆抗体的制备及鉴定[J].经济动物学报,2021,25(2):95-101,107.