

基于铜离子显色反应的磁珠免疫分析快速检测 黄曲霉毒素 B₁

程慧, 龚蕾, 李诗瑶, 彭青枝

(湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北武汉 430070)

摘要: 本文提出了一种基于抗体功能化纳米氧化铜信号示踪的比色免疫分析检测黄曲霉毒素 B₁。本方法的建立是基于羧基化磁珠表面共价结合抗体与黄曲霉毒素 B₁ 高效结合后, 再与静电吸附在纳米氧化铜表面的抗体特异性识别, 定量结合的氧化铜标记物可经酸溶解释放出高浓度的铜离子, 加入脞类铜离子显色剂即可生成红色络合物, 紫外-可见吸收光谱法测定该红色溶液的吸光度, 或直接通过目视比色法即可方便地实现免疫分析信号转导从而实现快速检测黄曲霉毒素 B₁。结果表明, 在培育时间为 15 min 及加入显色剂浓度为 10 μmol/L 时, 该方法具有较高的检测灵敏度并在 0.01~100 ng/mL 范围内具有良好的相关性, 检测下限是 0.035 ng/mL。此外, 该方法已经成功应用于分析大米样品中的黄曲霉毒素 B₁, 其结果与 GB 5009.22 中的方法相一致。

关键词: 磁珠免疫分析; 显色反应; 黄曲霉毒素 B₁

文章篇号: 1673-9078(2018)06-212-217

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.6.029

Rapid Detection of Aflatoxin B₁ by Magnetic Bead Immunoassay Based on Copper Chromogenic Reaction

CHENG Hui, GONG Lei, LI Shi-yao, PENG Qing-zhi

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China)

Abstract: A method of colorimetric immunoassay based on functionalization of copper oxide nanoparticles was established for the rapid and sensitive detection of Aflatoxin B₁ (AFB₁), a tumor biomarker. The method was established based on that the carboxyl covalent bonding magnetic bead surface antibody was highly bound to aflatoxin B₁, and then was specifically recognized by the electrostatic adsorption on the surface of the nano copper oxide, and the quantitative bound copper oxide marker could release high concentration of copper ions by acid solution, and then the copper ion chromogenic agent of the hydrazone could generate red complexes. The absorbance of the red solution was determined by the ultraviolet visible absorption spectrometry, or directly through the visual colorimetric method, which could easily realize the signal transduction of immune analysis so as to realize rapid detection of aflatoxin B₁. The results showed that the method had a high detection sensitivity and a good correlation in the range of 0.01 to 100 ng/mL when the incubation time was 15 min and the concentration of chromogenic agent was 10 μmol/L. In addition, this method has been successfully applied to the analysis of aflatoxin B₁ in rice samples, and the results were consistent with those in GB 5009.22.

Key words: magnetic bead immunoassay; colorimetric analysis; aflatoxin B₁

医学研究表明, 黄曲霉毒素 B₁ 具有强烈的毒性和致癌性^[1-4]。近年来, 为了满足现场食品检测的需要, 发展各种高灵敏免疫分析方法以用于真菌霉毒素的准确检测方法操作方便, 成本较低, 且信号转导更加直观简单, 因此在实际应用中具有较好发展前景^[5-8]。相

收稿日期: 2018-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 21475033)

作者简介: 程慧 (1989-), 女, 助理工程师, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 彭青枝 (1967-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量与安全

对于电化学、荧光和电化学发光等信号转导的方法, 比色免疫分析法在方法简单、成本低及可快速直接得到结果等方面的优势明显^[9-12]。但是, 如何提高比色免疫分析方法的灵敏度, 降低传统酶催化比色免疫分析方法的检测成本仍然是该领域面临的重要挑战。

最近, 大量具有特殊化学结构的有机配体可以选择性地与不同金属离子形成各种不同颜色、具有强吸附性能的复合物^[13,14]。基于此, 金属离子的显色反应被广泛用于比色法。此外, 为了有效降低传统酶催化比色免疫分析方法的成本, 同时增强信号转导, 一些非酶标记的金属或金属纳米材料被用作标记物^[15-19]。

这种金属纳米标记物不仅可以直接检测,而且在处理后很容易释放大量的金属离子。将非酶纳米探针和金属离子显色反应相结合,从而发展一种新的免疫比色法^[20-23]。

根据之前报道合成的脲类铜离子显色剂可以与铜离子反应生成红色络合物^[24],通过紫外-可见吸收光谱法测定该红色溶液的吸光度,或直接通过目视比色法。本实验将磁珠免疫分析与铜离子显色反应相结合,发展了一种基于抗体功能化纳米氧化铜信号示踪的比色免疫分析检测黄曲霉毒素 B₁。如图 1,基于磁珠免疫分析平台,纳米氧化铜标记物和黄曲霉毒素 B₁ 被成功应用于免疫反应。定量结合的氧化铜标记物可经酸溶解释放出高浓度的铜离子,加入脲类铜离子显色剂,即可生成红色络合物。基于铜离子和脲类铜离子显色剂形成的红色络合物作为信号转导来源,建立了一种新型比色免疫法用于定量检测黄曲霉毒素 B₁。

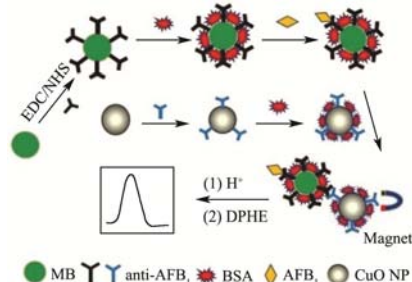


图 1 基于抗体功能化 CuO NP 纳米探针和 Cu²⁺ 显色反应的免疫分析原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of immune analysis based on anti-AFB₁ functionalized CuO NP probe and Cu²⁺ chromogenic reaction

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

黄曲霉毒素 AFB₁ 标准品购于厦门波生生物技术有限公司;鼠抗 AFB₁ 单克隆抗体、AFB₁-BSA、驴抗鼠二抗购于武汉博士德生物技术有限公司;2-吗啉乙磺酸(MES)、乙基-(3-二甲基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、脲类铜离子显色剂(DPHE)、CuO NPS 均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;四氢呋喃(THF)等其他试剂均购于上海国药化学试剂公司;黄曲霉毒素 B₁、赭霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀烯酮、桔霉素、展青霉毒素标准品(纯度 ≥98%):北京中科质检生物技术有限公司;抗坏血酸、脲类铜离子显色剂,叠氮酸钠(NaN₃)、2-吗啉乙磺酸、乙基-(3-二甲基丙基)碳二亚胺盐酸盐、N-羟基琥珀酰亚胺、脲类铜离子显色剂:西格玛(中国)有限公司;

黄曲霉毒素 B₁ ELISA 检验试剂盒购自北京华安麦科生物技术有限公司;纳米磁珠、氧化铜纳米粒子(CuO NP):美国量子科学仪器公司。PBS 缓冲溶液用作洗涤和结合缓冲液,购自北京索莱宝科技有限公司。

UV-3100 紫外-可见分光光度计:日本日立公司;酶标仪:赛默飞世尔科技有限公司;AB SCIEX 4500 高效液相色谱串联质谱:上海爱博才思分析仪器贸易有限公司;恒温振荡器:苏州吉米诺仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体功能化 CuO NP 纳米探针的制备

将 1 mg CuO NP 分散于 1.0 mL 的 10 mmol/L PBS 7.4 中超声 10 min 混匀,向其中加入 100 μL 1.0 mg/mL 驴抗鼠二抗室温混匀组装 4 h,将所得产物离心洗涤除去过量的抗体后,分散于 1.0 mL 的 10 mM PBS 7.4。之后再离心除去多余的 CuO NP 后分散于 5%(m/v) BSA 溶液中封闭反应 1 h。最后,将所得的抗体功能化 CuO NP 纳米探针经离心洗涤,分散于 500 μL pH 7.4 的 PBS 溶液中,4 °C 保存待用。

1.2.2 免疫磁珠的制备

采用 EDC/NHS 法将纳米磁珠的羧基与鼠抗 AFB₁ 单克隆抗体上的氨基偶联。2 mg 磁珠用 500 μL MEST(10 mmol/L MES, pH 6.0, 0.05% Tween 20)洗涤两次,400 μL MES(10 mmol/L, pH 6.0)重悬浮磁珠后加入 2 mg/mL EDC/NHS(现配现用),置于涡旋仪上混匀使其充分悬浮,37 °C 活化 30 min。磁分离移除上清,加入 500 μL MEST 洗涤两次, PBST(pH 7.4, 含 1% BSA)重悬后加入 40 μg 鼠抗 AFB₁ 单克隆抗体于 4 °C 混匀过夜,磁分离移除上清,用 500 μL PBST 洗涤 4 次后重悬于 1 mL PBST(pH 7.4, 含 0.02% NaN₃, 0.5% BSA),4 °C 保存备用。

1.2.3 检测方法及步骤

首先,向制备的 40 μL 免疫磁珠中加入 100 μL 不同浓度的 AFB₁ 标准样品或样品提取液,室温震荡 15 min 后通过 PBS 和 PBST 洗净。之后,向其中加入 140 μL CuO NP 纳米探针分散液,继续震荡 10 min 之后利用 pH 7.4 Tris-HCl 充分洗净。接着,加入 10 μL 0.1 M HCl 释放出定量结合的铜离子,接着加入 110 μL pH 7.0 含有 10 μM 脲类铜离子显色剂的 Tris-HCl/THF 溶液,进行显色反应得到红色溶液,通过紫外-可见吸收光谱法测定该红色溶液的吸光度进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 抗体功能化 CuO NP 纳米探针的显色反应

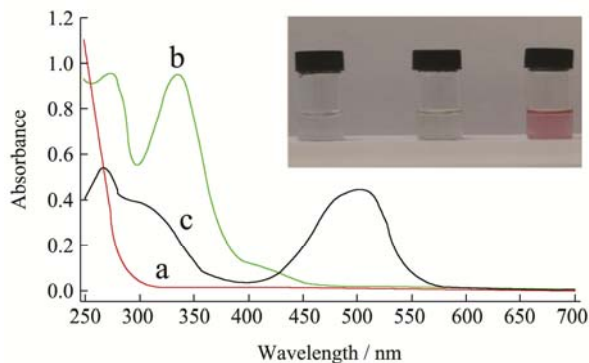


图2 紫外可见吸收光谱图和相应溶液的图片

Fig.2 UV-Vis absorption spectra and the photographs of the corresponding solutions(inset)

注: a 表示 0 μmol/L Cu²⁺溶液、b 表示 10 μmol/L DPHE 溶液、c 表示 0 μmol/L Cu²⁺溶液+10 μmol/L DPHE 溶液

根据文献方法,铜离子和脲类铜离子显色剂可以形成红色络合物^[24]。如图2,脲类铜离子显色剂的紫外-可见吸收光谱在335 nm处呈现明显的特征吸收,而4.0 μmol/L铜离子溶液在250~700 nm之间无特征吸收峰(曲线a和b)。将4.0 μmol/L铜离子溶液与10 μmol/L脲类铜离子显色剂混合后所得溶液在502 nm处呈现明显的特征吸收,同时,脲类铜离子显色剂在335 nm处的特征吸收峰有所减弱(曲线c)。从插图中我们不难发现在加入铜离子的脲类铜离子显色剂中出现明显的由黄色到红色的颜色变化过程。这一结果表明铜离子和脲类铜离子显色剂反应形成了红色络合物,而且它们紫外特征吸收峰的差别更加有利于避免显色剂对铜离子显色的干扰。

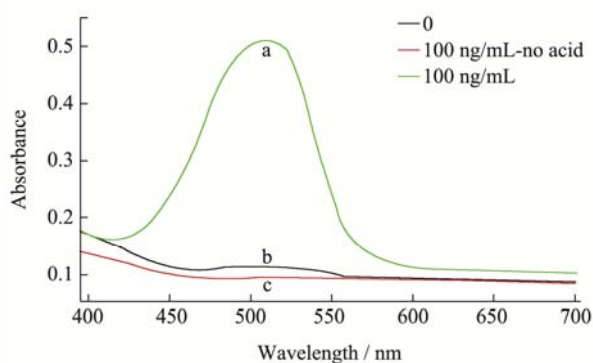


图3 磁珠对不同免疫显色反应紫外可见吸收光谱图

Fig.3 UV-Vis absorption spectra recorded by different immunochromatographic reaction

注: a 表示 100 ng/mL AFB₁的免疫显色反应、b 表示空白背景、c 表示未加入酸 100 ng/mL AFB₁的免疫显色反应。

将铜离子显色反应与抗体功能化 CuO NP 纳米探针相结合以用于免疫反应的信号转导(图3)。通过磁珠免疫分析平台上的免疫反应,纳米氧化铜标记物被定量捕获到磁珠表面形成磁性免疫复合物。在加入酸

之后磁性免疫复合物释放出定量捕获的铜离子,该铜离子与显色剂反应生成红色络合物以实现定量分析。从图1B我们可以看出对100 ng/mL AFB₁进行该反应之后在502 nm处有较强的吸收峰(曲线a)。然而,若形成磁性免疫复合物后未加入酸,那么在400~700 nm之间就没有特征吸收峰(曲线b)。同时,背景空白表现的微弱吸收峰主要是由于非特异性吸附(曲线c)。因此,以上现象说明502 nm处的较强吸收峰主要是由于磁性免疫复合物释放铜离子后引起的显色反应,基于免疫磁珠的显色反应可应用于对 AFB₁的检测分析。

2.2 条件优化

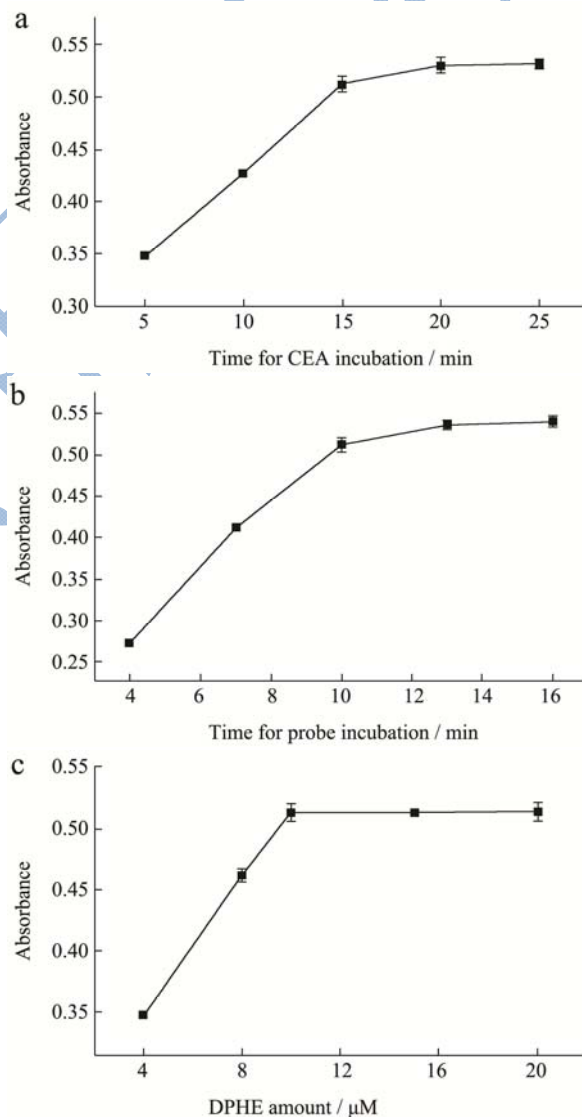


图4 温育 AFB₁ (a)、纳米探针(b)的时间和 DPHE 浓度(c)对 100 ng/mL AFB₁在免疫显色反应上吸光度的影响

Fig.4 Effects of the time of AFB₁ (a) and probe (b) incubation, and the DPHE concentration of chromogenic reaction (c) on the absorbance response of 100 ng/mL AFB₁

温育时间是影响免疫分析性能的另一个重要因素。实验分别研究了不同温育时间下 100 ng/mL AFB₁ 与抗体功能化的 CuO NP 纳米探针对免疫反应的紫外吸收响应强度的影响。如图 2 所示,随着免疫反应温育时间的增加,紫外吸收峰的响应强度不断增大,当温育 AFB₁ 的时间达到 15 min (图 4a) 以及温育纳米探针的时间达到 10 min 后响应达到一个平台(图 4b)。该结果说明 AFB₁ 与纳米探针分别在 15 min 和 10 min 时使免疫反应可以达到饱和状态。为了保证磁性免疫复合物释放的铜离子与显色剂充分反应,实验研究了不同浓度的显色剂对 100 ng/mL AFB₁ 夹心免疫反应的紫外吸收响应强度变化。如图 4c 所示,随着显色剂浓度的增加,紫外吸收峰的响应强度不断增大,当显色剂浓度为 10 μmol/L 后响应达到一个平台。因此,本实验中所用的显色剂浓度为 10 μmol/L。

2.3 分析性能

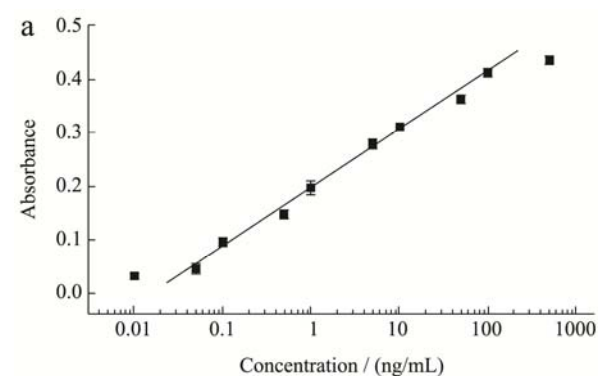


图 5 a 图为不同浓度的 AFB₁ 的工作曲线, b 图为 AFB₁ 浓度对应的颜色变化

Fig.5 (a) Calibration curve of the different concentrations of AFB₁; (b) Color change of the detection solution corresponding to the marked concentrations of AFB₁ (ng/mL)

在最优实验条件下,实验通过紫外可见吸收峰考查了不同浓度 AFB₁ 在该磁性免疫反应中的响应情况。从图 5a 可以看出,502 nm 处的吸收峰随着 AFB₁ 浓度的增加而不断增大,其吸光度与 0.01~100 ng/mL AFB₁ 的对数值成较好的线性关系,线性回归方程为:

$y=0.2998+0.1075\lg C$ (ng/mL), 相关系数为 0.995。信噪比为 3 时,计算得该方法的检测限为 35 pg/mL。

2.4 特异性、重复性、稳定性和可靠性

为了考察该方法的特异性,实验分别考察了黄曲霉毒素 B₁、赭霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀烯酮、桔霉素和展青霉素标准品在该免疫磁珠上的信号响应,质量浓度分别为 2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL,经免疫磁珠检测,每个浓度重复 3 次,判断免疫磁珠的特异性,结果见表 1,与黄曲霉毒素 B₁ 在该免疫磁珠上的灵敏信号响应相比,赭霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀烯酮、桔霉素和展青霉素在该免疫磁珠上并没有引起明显的信号响应,这一结果说明非特异性真菌毒素在该免疫磁珠上引起的交叉反应较小,检测方法的特异性良好。

表 1 特异性试验结果

Table 1 Results of Specificity experiments

标准品质量浓度/(ng/mL)	2	5	10
黄曲霉毒素 B ₁	1.97	4.92	9.96
赭霉毒素 A	0.12	0.18	0.20
玉米赤霉烯酮	0.17	0.14	0.12
脱氧雪腐镰刀烯酮	0.25	0.13	0.22
桔霉素	0.19	0.24	0.11
展青霉素	0.09	0.16	0.16

将同批和不同批次的免疫磁珠分别检测 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准品,每个质量浓度重复测 3 次,结果见表 2,检测方法的检测结果相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.0%~2.5%,表明该检测方法具有较好的重复性。将同一样品分别放置 0、0.3 h、0.5 h、0.7 h、1.0 h 后测定一次,分别记录吸光度值,结果见表 3。高质量浓度黄曲霉毒素 B₁ 标准品(100 ng/mL)与低质量浓度黄曲霉毒素 B₁ 标准品(1 ng/mL)吸光度值在 1.0 h 内均变化不明显,由此可以说明样品溶液在避光冷藏条件下放置 2.0 h 内稳定性良好。

称取 3 个未知黄曲霉毒素 B₁ 含量的大米各 5 份进行平行性试验,结果见表 4。由表 4 可知,3 个黄曲霉毒素 B₁ 含量不同的样品平行实验结果的相对标准偏差均<10%,结果表明该方法精密度良好。在大米样品中添加一定含量的黄曲霉毒素 B₁ 标准品,使最终质量浓度为 2 μg/kg、5 μg/kg 和 10 μg/kg。经提取回收,将高效液相色谱串联质谱、酶联免疫试剂盒所得分析结果与免疫比色法分析结果相比较,结果见表 5。由表 5 可知,免疫比色法回收率在 99.3%~117.9%,表明将该方法用于实际样品分析具有良好的可靠性和准确度。

表2 重复性试验结果

Table 2 Results of repeatability experiments

AFB ₁ /(ng/mL)	1	2	3	4	5	RSD/%
5	4.915	5.113	4.947	5.098	4.988	2.5
10	10.126	9.986	10.157	9.946	10.161	1.0
20	20.113	19.427	19.289	20.069	19.115	2.3
50	48.869	49.085	50.365	49.177	50.362	1.5

表3 稳定性试验结果

Table 3 Results of stability experiments

避光冷藏放置时间/h	高质量浓度黄曲霉毒素 B ₁ (100 ng/mL) 吸光度值	低质量浓度黄曲霉毒素 B ₁ (1 ng/mL) 的吸光度值
0	0.514	0.289
0.3	0.512	0.296
0.5	0.519	0.294
0.7	0.502	0.292
1.0	0.501	0.294

表4 精密度试验结果

Table 4 Results of precision experiments

试验号	黄曲霉毒素 B ₁ 含量/(μg/kg)					RSD/%
	1	2	3	4	5	
1	2.185	2.294	2.017	1.916	2.328	8.26
2	2.403	1.968	2.013	2.375	2.216	9.13
3	1.711	1.638	1.473	1.861	1.504	9.67

表5 加标回收试验结果

Table 5 Results of adding standard recovery

加标量/(μg/kg)	方法	样品中黄曲霉毒素 B ₁ 含量	1	2	3	回收率/%
2	液相串联质谱	2.506	4.588	4.571	4.685	102.4
	酶联免疫试剂盒		4.497	4.455	4.469	99.3
	免疫比色分析法		4.602	4.594	4.586	102.0
5	液相串联质谱	2.816	7.796	8.016	7.963	101.4
	酶联免疫试剂盒		8.021	7.985	8.107	102.8
	免疫比色分析法		8.046	7.895	7.947	101.9
10	液相串联质谱	1.658	12.015	11.792	11.465	100.8
	酶联免疫试剂盒		11.579	11.842	11.962	117.9
	免疫比色分析法		11.988	11.597	11.794	101.2

3 结论

本工作发展了基于铜离子显色反应离子的新型免疫比色法用于检测大米中黄曲霉毒素 B₁。通过在磁珠上共价固定捕获抗体,免疫反应后定量捕获到免疫磁珠表面的铜纳米探针,其在酸的作用下释放出大量铜离子,铜离子与显色剂结合后生成红色络合物,通过紫外-分光光度计检测吸光度。标准曲线及方法学验证结果显示:方法的最低检测限为 0.035 ng/mL,免疫比色法的标准线性回归方程 $y=2.998+1.075\lg x(\text{ng/mL})$,相关系数 $R=0.995$;精密度试验结果 RSD 为 <10%,

加标回收率在 99.3%~117.9%之间,溶液在避光冷藏放置 h 内稳定,免疫比色法检测结果与 GB 5009.22-2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》液相色谱法及酶联免疫法试剂盒法的检测结果无显著性差异($p>0.05$)。结果表明该免疫比色法在实际应用中具有较好的发展前景。

参考文献

- [1] 李力,曹以诚,区镜深,等.黄曲霉毒素 B₁ 致癌毒性相关基因的生物信息学分析[J].现代食品科技,2013,29(8):1994-1999
LI Li, CAO Yi-cheng, QU Jing-shen, et al. Bioinformatic

- analysis of genes relative to the carcinogenic toxicity of aflatoxin B₁ [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(8): 1994-1999
- [2] 能静,王玉洁,郝侃,等.金磁纳米颗粒的制备及其在表面增强拉曼光谱快速检测黄曲霉毒素 B₁ 中的应用[J].*现代食品科技*,2017,33(1):145-151
- NENG Jing, WANG Yu-jie, JIA Kan, et al. Fabrication of gold magnetic nanoparticles and their application for rapid detection of aflatoxin B₁ using surface-enhanced raman spectroscopy [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 145-151
- [3] 余宇燕,王彤颖,邹艳辉,等.纳米金生物条形码技术检测坚果中的黄曲霉毒素 B₁[J].*现代食品科技*,2016, 32(8):278-283
- YU Yu-yan, WANG Tong-ying, ZOU Yan-hui, et al. Detection of AFB₁ in nuts by a nanoparticle-based bio-barcode assay [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(8): 278-283
- [4] 邓建英,孙旭峰,凌颖敏.比对实验中黄曲霉毒素 B₁ 的检验与分析[J].*现代食品科技*,2012,28(9):1254-1256
- DENG Jian-ying, SUN Xu-feng, LING Ying-min. Comparison experiment of aflatoxin B₁ in inspection and analysis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(9): 1254-1256
- [5] 管笛,潘灿平,王文,等.磁微粒酶联免疫吸附法测定玉米中的伏马毒素 B₁[J].*食品科学*,2014,35(8):208-212
- GUAN Di, PAN Can-ping, WANG Wen, et al. Development of a magnetic particle-based enzyme-linked Immunosorbent assay for determining fumonisin B₁ in Corn [J]. *Food Science*, 2014, 35(8): 208-212
- [6] 管笛,亢子佳,贾迪,等.磁微粒酶联免疫吸附法测定玉米中的黄曲霉毒素 B₁[J].*食品科学*,2016,37(5):101-105
- GUAN Di, KANG Zi-jia, JIA Di, et al. Development of a magnetic particles enzyme-linked Immunosorbent assay for determination of aflatoxin B₁ in corn [J]. *Food Science*, 2016, 37(5): 101-105
- [7] 兰珊珊,陈锦玉,邵金良,等.酶联免疫法测定苦荞制品中的黄曲霉毒素 B₁[J].*现代食品科技*,2013,29(6):1417-1419
- LAN Shan-shan, CHEN Jin-yu, SHAO Jin-liang, et al. Determination of aflatoxin B₁ in tartary buckwheat products by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(6): 1417-1419
- [8] 徐艳群,罗自生,徐庭巧,等.免疫亲和柱净化-大体积流通池高效液相色谱法同时检测食品中 6 种黄曲霉毒素[J].*现代食品科技*, 2015,31(10):301-306
- XU Yan-qun, LUO Zi-sheng, XU Ting-qiao, et al. Simultaneous determination of six aflatoxins in food by Immunoaffinity purification-high performance liquid chromatography combined with a large volume flow cell [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(10): 301-306
- [9] Qu W, Liu Y, Liu D, et al. Copper-mediated amplification allows readout of immunoassays by the naked eye [J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 50(15): 3504-3507
- [10] Rica R, Stevens M M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye [J]. *Nature Nanotechnology*, 2012, 186(7): 821-824
- [11] Wang Z, Yang X, Yang J, et al. Peroxidase-like activity of mesoporous silica encapsulated Pt nanoparticle and its application in colorimetric immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 862(3): 53-63
- [12] Lai W, Tang D, Zhuang J, et al. Magnetic bead-based enzyme chromogenic substrate system for ultrasensitive colorimetric immunoassay accompanying cascade reaction for enzymatic formation of squaric acidiron(III) chelate [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(10): 5061-5068
- [13] Kaur N, Kumar S. Colorimetric metal ion sensors [J]. *Tetrahedron*, 2011, 67(48): 9233-9264
- [14] Zhang J F, Zhou Y, Yoon J, et al. Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of precious metal ions (silver, gold and platinum ions) [J]. *Chemistry Society Reviews*, 2011, 40(10): 3416-3429
- [15] Lai G S, Wu J, Ju H X, et al. Streptavidin-functionalized silver-nanoparticleenriched carbon nanotube tag for ultrasensitive multiplexed detection of tumor markers [J]. *Advanced Functional Materials*, 2011, 21(15): 2938-2943
- [16] Xu Q N, Yan F, Lei J P, et al. Disposable electrochemical immunosensor using carbon sphere/gold nanoparticles composite as label for signal amplification [J]. *Chemistry A European Journal*, 2012, 18(16): 4994-4998
- [17] Wei Q, Li T, Wang G, et al. Fe₃O₄ nanoparticles-loaded PEGePLA polymeric vesicles as labels for ultrasensitive immunosensors [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(28): 7332-7339
- [18] Tu M C, Chen H Y, Wang Y, et al. Immunosensor based on carbon nanotube/manganese dioxide electrochemical tags [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 853(1): 228-233
- [19] Wen G M, Ju H X. Ultrasensitive photoelectrochemical immunoassay through tag induced exciton trapping [J]. *Talanta*, 2015, 134(1): 496-500
- [20] 陈淑贤,刘静,吴振,等.基于 PtNPs-PV 的双重放大免疫比色

- 法检测肉中莱克多巴胺痕量残留的研究[J].现代食品科技, 2016,32(1):278-312
- CHEN Shu-xian, LIU Jing, WU Zhen, et al. Dual-amplified colorimetric immunoassay based on PtNPs-PV for detection of ractopamine at Ultra-trace Level in meat samples [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 278-312
- [21] 白文荟,刘金钊,陈爱亮.纳米金比色法在食品安全检测中的应用研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014,5(7): 1944-1950
- BAI Wen-hui, LIU Jin-chuan, CHEN Ai-liang. Gold nanoparticle based colorimetry and its application in rapid detection for food safety [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(7): 1944-1950
- [22] 何庆华,许杨,刘师文.一种新型诊断方法-比色法免疫学实验在检测风疹病毒中的应用研究[J].中国计划免疫,2006, 12(6):489-494
- HE Qing-hua, XU Yang, LIU Shi-wen. Application of the new diagnosis on detecting rubella viral infection [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2006, 12(6): 489-494
- [23] 张静,陈琳,陈伟,等.基于谷胱甘肽识别系统的胶体金比色法快速检测水中重金属铅离子[J].食品科学,2017, 38(24): 202-207
- ZHANG Jing, CHEN Lin, CHEN Wei, et al. Gold nanoparticles-based glutathione recognition for rapid colorimetric detection of lead ion in water [J]. Food Science, 2017, 38(24): 202-207
- [24] Hu S L, Song J J, Zhao F, et al. Highly sensitive and selective colorimetric naked-eye detection of Cu²⁺ in aqueous medium using a hydrazone chemosensor [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015, 215(32): 241-248