小分子物质酶联免疫分析方法的研究进展

詹屋强, 王 弘*

(华南农业大学食品学院, 广东省教育厅食品质量安全重点开放实验室, 广州 510642)

摘 要: 自免疫分析技术问世以来, 出现了多种快速检测产品如 ELISA 试剂盒、免疫层析试纸条, 但是目前的快速检测试剂盒普遍存在检测灵敏度低、线性范围窄、易出现假阳性等问题。为解决这些问题, 科研工作者发现小分子物质在检测中显示出许多特点, 而这些特点正是研究开发酶联免疫检测技术的关键, 小分子物质的快速检测已占据越来越重要地位。本文归纳国内外小分子物质酶联免疫分析技术研究成果, 总结小分子物质酶联免疫分析方法的内容及特点, 介绍小分子物质酶联免疫分析方法中抗原制备特点, 分析小分子物质检测中抗体种类及特性, 重点比较酶联免疫分析方法中直接和间接竞争法, 并分析非竞争法在小分子物质检测中优势, 旨在为今后免疫学快速检测技术的研究与开发提供帮助。

关键词: 小分子物质; 酶联免疫分析; 竞争法; 非竞争法

Research progress on enzyme-linked immunoassay for small molecules substances

ZHAN Wu-Qiang, WANG Hong*

(*Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety*, *College of Food Science*, *South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510642, *China*)

ABSTRACT: Since immunoassy technology was developed, detective products such as ELISA kit, immune chromatography strips hadbeen invented, but the current production of rapid detection kit showed alow detection sensitivity, with a narrow linear range and high false positive rate. To solve these problems, researchers found that smaller molecules showed many characteristics when detected, and these characteristics werethe key to research and develop enzyme-linked immunoassy technology. Rapid quantify small molecules occupied an important position in rapid detection. In this paper, domestic and foreign research achievements about enzyme-linked immunoassay technology were summarized. The content and characteristics of detection method of small molecule base on enzyme-linked immunoassay were reviewed. The characteristics and research status of antigen preparation of the small molecular substances based on ELISA were introduced. Meanwhile, the direct and indirect competition of enzyme-linked immunoassay methods were compared and advantage of noncompetitive enzyme linked immunoassay method for the detection of small molecular substances was analyzed. The purpose is to assist research and development of enzyme-linked immunoassay method of small molecules.

KEY WORDS: small molecules substances; enzyme-linked immunoassay; competition; noncompetition

*通讯作者: 王弘, 教授, 博士, 主要研究方向为食品安全与营养。E-mail: gzwhonggd@163.com

***Corresponding author:** WANG Hong, Professor, Ph.D, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China. E-mail: gzwhonggd@163.com

1 引 言

抗原-抗体免疫分析技术问世以来，针对快速检测小分子物质酶联免疫分析(enzyme-linked immunoassay, ELISA)技术的研究从未曾间断。酶联免疫吸附测定技术的应用始于医学临床检测毒素和葡萄球菌肠毒素[1]。1987 年，Ross 等将 ELISA 应用于检测脱落酸[2]。1994 年，Yang 等人将 ELISA 应用于检测植物中的细胞分裂素[3]。同年，Ibrahim[4]等采用杂交瘤技术制备对硫磷特异性单克隆抗体，并使用 ELISA 技术检测其含量，实现了将 ELISA 应用到小分子有机磷农药的检测。2005 年，刘仁荣等将竞争性 ELISA 法应用于赭曲霉毒素 A[5]。2011 年，王雨晨等将间接竞争 ELISA 法应用于伏马毒素 B1[6]。目前为止，针对重金属如镉(Cd)、汞(Hg)等酶联免疫的分析方法已经建立[7,8]。2014 年，Wu[9]等报道可乐添加物中具有致癌性的 4-甲基咪唑的间接竞争 ELISA 检测法。

市场上出现了各类快速检测产品如 ELISA 试剂盒、免疫层析试纸条，但是目前快速检测试剂盒普遍存在检测灵敏度低、线性范围窄、易出现假阳性等问题。为解决这些问题，科研工作者发现小分子物质在检测中显示出许多特点，而这些特点正是研究开发酶联免疫检测技术的关键。首先，小分子物质分子量小，不具备免疫原性，不能使动物直接产生抗体，需要先合成半抗原再与大分子蛋白偶联才能成为免疫原。其次，基于快速检测的这种抗原-抗体的反应模式，小分子物质与抗体结合后，其大部分表面积被包裹，不能与另一种抗体结合，限制了小分子抗体的双抗夹心法的应用[10]。可见，竞争法是小分子物质检测中研究最多的。因此，本文比较直接竞争法和间接竞争法的研究特点并进行总结，为今后进行 ELISA 研究提供思路。此外，基因工程抗体、噬菌体展示技术的发展，抗体体积大大缩小，基于“抗体-抗原-抗体”模式建立的非竞争法是一种新型检测方法。

2 酶联免疫分析方法的人工抗原合成和抗体种类

酶联免疫分析方法是通过抗原和抗体特异性反应及酶与底物显色反应来实现对药物快速灵敏检测的一种方法。因此人工抗原合成及抗体选择是酶联免疫反应的关键步骤。

2.1 人工抗原合成

过去 30 年，人们在小分子半抗原合成中偶联点、抗原决定簇选择、探索可行化学合成方法等方面进行大量研究，制备农药分子人工抗原已经取得一些进展。小分子物质(分子质量小于 1000 u)不具备免疫原性，需要与大分子蛋白质进行偶联合成人工抗原，并诱导动物机体才能产生抗体。人工抗原由半抗原与大分子蛋白偶联形成，多数小分子物质如农药小分子，需经过衍生化作用合成半抗原，一般在有机小分子上引入带有偶联基团(如-NH_2、-NO_2、-COOH、-OH)的化合物，有时这些化合物还需具有一定复杂结构(分支结构、苯环或杂环)[11]。而如果被检测的是重金属，则引入螯合剂合成半抗原。半抗原合成直接影响后期制备抗体质量，是酶联免疫检测方法的关键环节。

2.2 特异性抗体种类

抗体亲和力和特异性是建立 ELISA 的必备条件，用于检测的抗体主要分为多克隆抗体、单克隆抗体及基因工程抗体。

多克隆抗体容易制备，在酶联免疫分析检测中用广泛，但是特异性不够强，个体差异大，不利于免疫分析方法标准化。单克隆抗体具有较好特异性，近几年有关研究很多，但是制备复杂、耗时、成本高和效率低。

基因工程抗体具有可塑性强、无需动物免疫即可批量生产等特点。目前基因工程抗体包括人-鼠嵌合抗体、改型抗体、双特异性抗体、小分子抗体等。所谓小分子抗体是指相对分子质量较小但具有抗原结合功能的抗体分子片段，包括 Fab、Fv、scFv 等，其中 Fab 和 scFv 是目前小分子抗体研究的重点。Emma[12]等通过构建重组抗体 Scfv，利用 ELISA 法检测氟醚唑，得到最低检测限为 1 ng/mL。但是 Won[13]，María-José[14]等发现单链抗体 Scfv 亲和力比单克隆抗体低。此外，Scfv 稳定性不强，它和融合蛋白甚至会发生聚集沉淀[15]。

但是，随着基因工程抗体技术如抗体克隆、抗体基因组合文库技术、核糖体展示技术及抗体改型技术发展，基因工程抗体已然成为检测应用新宠。

3 直接竞争和间接竞争酶联免疫分析方法

小分子物质酶联免疫分析技术按照抗原-抗体反应模式，可分为竞争法、非竞争法。

竞争法又分为直接竞争法(direct competitive-ELISA, dc-ELISA) 和间接竞争法 (indirect competitive-ELISA, ic-ELISA)。直接竞争方法是将抗体固定，然后加入酶标抗原与被检测物竞争，被检测物浓度高时，酶标抗原结合固定抗体的量就低，反之，酶标抗原结合固定抗体的量就高。底物显色程度用 OD 值表征，因此根据 OD 值的大小能得到被检测物浓度。间接竞争法是将人工包被抗原固定，加入抗体和被分析物的混合物，当被分析物浓度高时，结合到固定抗原的抗体就少，再加入酶标抗体，加入底物显色，亦能根据 OD 值大小得到被检测物浓度。

直接竞争法和间接竞争法两种方法各有优势，相对于间接竞争法来说，直接竞争法用时短，但是两种方法的灵敏度高低根据物质不同有所不同。Kolosova[16]等利用单克隆抗体对甲基对硫磷分别进行直接、间接竞争酶联免疫测定，ic-ELISA 对甲基对硫磷最低检出限为 0.08 ng/mL，所需时间 3.5 h; dc-ELISA 法最低检出限 0.5 ng/mL，其所需

时间仅 1.5 h。而 Kim[17]等用单克隆抗体对吡虫啉建立直接、间接 ELISA, ic-ELISA 得到的 IC_{50} 值和检测限为 0.8 和 0.1 μg/L, dc-ELISA 得到的 IC_{50} 值和检测限为 0.3 和 0.03 μg/L。实际上在小分子物质检测中, 间接竞争法多于直接竞争法, 其原因可能是直接竞争法需要将药物或半抗原与酶偶联, 而这种偶联物不稳定, 多次使用会使其灵敏度降低。近年来, 很多学者因直接竞争法用时少而备受关注, 吴璟等采用直接竞争法对食物中丙烯酰胺检测, 检出限为 3.0 μg/L,线性范围为 9.2~195 μg/L, 表明本法可用于食品中丙烯酰胺的快速检测[18]。李瑞婷等应用直接竞争法检测保健食品中西地那非, 该方法半抑制浓度 IC_{50} 为 1.47 ng/mL,线性范围(IC_{20}~IC_{80})为 0.12~17.65 ng/mL,检测限 IC_{15} 达到 0.0845 ng/mL[19]。

竞争性酶联免疫分析检测法以其灵敏、快速、能直观反应被测小分子有害物质浓度而在霉菌毒素、农药小分子、激素及重金属物质中应用广泛, 见表 1。

表 1　竞争性酶联免疫分析方法在小分子物质检测当中的的应用

Table 1　Application of competitive enzyme linked immunoassay for small molecular substances detection

分类	有害物质名称	测定方法	抗体类型	检测样本	检测限/线性范围	年限	参考文献
毒素类	黄曲霉毒素	ic-ELISA	M	牛奶	3 ng/L	2011	[20]
	T-2 毒素	ic-ELISA	M	水稻	5.80 ng/kg	2014	[21]
	赭曲霉毒素 A	dc-ELISA	M	无花果干	0.18 ng/mL	2012	[22]
	伏马毒素 B1	ic-ELISA	M	玉米	1.0 ng/mL	2014	[23]
农药类	氯虫苯甲酰胺	ic-ELISA	M	-	0.18 ng/mL	2014	[24]
	百草枯	ELISA	P	小麦 大麦 土豆	(0.037±0.01) μg/kg (0.71±0.3) μg/kg (0.56±0.1) μg/kg	2014	[25]
	苯噻菌酯	ic-ELISA	M	-	0.428~7.55 ng/L	2014	[26]
	联苯菊酯	ic-ELISA	P	土壤	0.004 mg/L	2015	[27]
	杀菌剂百菌清	dc-ELISA	M	蔬菜	0.1~6.0 ng/ml	2014	[28]
重金属	镉	ic-ELISA	M	水、土壤、油菜	0.2~40 ng/mL	2012	[7]
	镉	dc-ELISA	M	_	0.3 μg/mL	2007	[8]
	汞	ic-ELISA	M	水、牛奶、青菜	0.1~100 ng/mL	2012	[29]
饲料中添加物	克伦特罗	dc-ELISA	P	-	0.13 ng/L 0.1~1000 μg/L	2011	[30]
	莱克多巴胺	dc-ELISA	P	尿、血清、肉	0.3 ng/kg	2013	[31]
	苯乙醇胺	ic-ELISA	P	-	0.03 ng/mL	2013	[32]
食品中非法添加	邻苯二甲酸二环己酯	dc-ELISA	P	液态食品	0.1~100 ng/mL	2014	[33]
	氯吡脲	dc-ELISA	M	猕猴桃和葡萄	10 ng/L	2012	[34]
	三(2,3-二溴丙基)异氰脲酸酯	ic-ELISA	M	_	0.06 μg/L	2014	[35]
	帽柱木碱	ic-ELISA	M	_	32.92~250 mg/mL	2014	[36]

注: “P”表示多克隆抗体; “M”表示单克隆抗体; “—”表示文献信息不详; “ic-ELISA”表示间接竞争 ELISA 法; “dc-ELISA”表示直接竞争 ELISA 法。

4 非竞争性酶联免疫分析法

传统双抗夹心法只能检测蛋白质、多糖等具有多个抗原表位的大分子物质，限制了小分子物质的使用[37]。国内外学者不断努力开发新型“抗体-抗原-抗体”的双抗夹心检测模式，且多倾向于研究以下两种方法。

开放夹心式免疫法(open sandwich immunoassay, OSIA)，利用抗体可变区片段 VH 和 VL 代替夹心法的两种抗体，VH 和 VL 之间作用力很弱，抗原存在能显著增强两者相互作用，且当这种增强作用越大灵敏度越好。Yuko[38]等将 OS-IA 运用于麻痹性贝类毒素得到检测范围为 0.1~1000 ng /mL，比普通 ELISA 的检测范围更宽。Masaki 等[39]将 OP-ELISA 与微流控芯片传感装置结合，12 min 检测小分子人骨钙素，检测限达到 1 μg/mL。这种方法完全避免反复孵育和洗涤过程，缩短了检测时间。

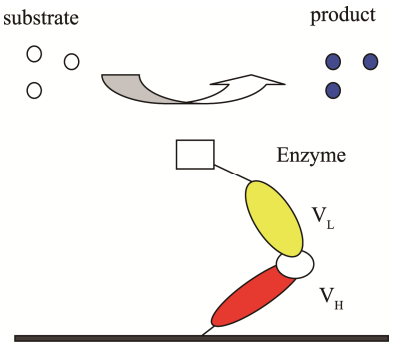

图 1 开放式夹心免疫法图

Fig. 1 Assay of open sandwich immune

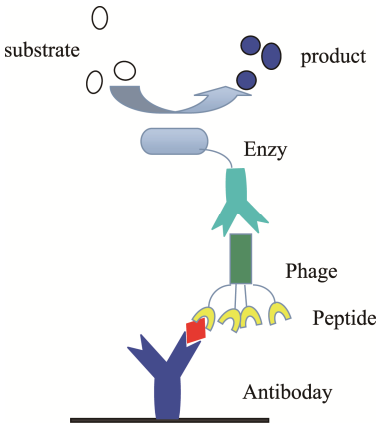

图 2 噬菌体抗免疫复合物分析法

Fig. 2 Assay of phage anti-immune complex

噬菌体抗免疫复合物分析法(phage anti-immune complex assay, PHAIA)，抗原和抗体结合后，大于 85%的抗原表面积被包埋，只有极小部分与抗体形成异型表位，而单克隆抗体对此并不识别。人们却发现能识别抗原抗体复合物的噬菌体展示短肽，从而发展出了 PHAIA。Dong[40]等利用噬菌体展示肽库筛选出能识别免疫复合物的具有 8 个氨基酸的噬菌体展示肽，并建立隐形孔雀石绿(LMG)的 PHAIA，其检测限和 SC_{50} 分别为 0.55 ng/mL 和 7.02 ng/mL，灵敏度比竞争法有所提高。Mariana[41]等发展 PHAIA，利用噬菌体展示技术得到抗免疫复合物多肽后与链霉亲和素融合成重组嵌合体，用于检测除草剂广灭灵，得到检测限和 SC_{50} 值分别为 0.48 ng/mL 和(2.2±0.3) ng/mL，分别是该抗体建立的竞争性分析方法检测限和 SC_{50} 的 8 和 13 倍，该方法建立了一种无需噬菌体参与的检测模式。

5 结论与展望

为提高酶联免疫反应灵敏度、准确度、检测效率，不断对其进行创新发展。如化学发光酶联免疫法、生物素-亲和素放大的酶联免疫分析法等。Tsvetomira[42]等将磁性纳米颗粒固定抗孕酮抗体检测牛奶样品中的孕酮，得到检测检测限低至 0.09 ng/mL，管笛[43]等引入超顺磁微粒，将羊抗兔抗体-磁微粒偶联物替代酶标板后，用直接竞争酶联免疫法检测玉米中伏马毒素 B1，结果具有更低检出限。由于磁微粒能够提供更大比表面积和更好流动性，能够避免空间位阻，使抗原抗体在液相中呈三维立体反应，因此相较常规酶标板，可使反应灵敏度得到提升。

小分子抗体因其可人工改造、大量生产特点，近年来受到食品药品小分子物质检测研究人员青睐，但是多数重组抗体的稳定性和亲和力会稍逊于单克隆抗体，其可能原因是抗体恒定区缺失、异源细胞表达后抗体不能有效折叠等。现代小分子抗体研究过程中，如果想要得到高质量抗体，采用分子模拟技术模拟抗体结构，为改变抗体基因提供依据是目前用于检测小分子抗体的发展方向。

非竞争免疫分析方法近几年开始发展，国内鲜有报道。与竞争酶联免疫法相比，非竞争法除具有更高灵敏度、精确度、线性范围外，其分析物含量与检测信号在竞争型免疫分析中呈正相关[10]。此外，非竞争法更适用于现场检测模式，如结合微流控芯片技术和生物传感法，或者制作纤维试纸条和免疫色谱分析[37]。因此，非竞争法应用于检测试剂盒、纤维试纸条是未来发展趋势。

参考文献

[1] Noterotoxin S, Verjans HL, Bol J, *et al*. Enzyme linked immunesorbent assay (ELISA) for determination of *Staphylococcus aureus enterotoxin* type B [J]. Health Lab Sci, 1978, 15(1): 28–31.

[2] Ross GS, Elder P A, McWha JA, *et al*. The development of an indirect enzyme linked immunoassay for abscisic acid [J]. Plant physiol, 1987, 85(1): 46–50.

[3] Yang ZH, Chen LF, Cao ZX. Immunoaffinity chromatographic and ELISA determination of cytokinins in germinating pollens in *Liliumdavidiidach* [J]. Acta Botanica Sinica, 1994, 36(6): 430–436

[4] Ibrahim AMA,Morsy MA, Hewedi MM, *et al*. Monoclonal antibody-

based ELISA for the detection of ethyl parathion [J]. Food Agric Immunol, 1994, 6(1): 23–30.

[5] 刘仁荣, 余宙, 何庆华, 等. 以赭曲霉毒素 A 单克隆抗体建立竞争酶联免疫吸附分析方法的研究[J]. 食品科学, 2005, 11: 154–157.
Liu RR, Yu Z, He QH, *et al*. Study on competitive enzyme-linked immunosorbentassay for ochratoxin Amonoclonal antibody determination [J]. Food Sci, 2005, 11: 154–157.

[6] 王雨晨, 王君, 王元凯, 等. 伏马毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法的建立[J]. 上海交通大学学报, 2011(2): 69–74.
Wang YC, Wang J, Wang YK, *et al*. Preparation of monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for fumonisin B1 detection [J]. J Shanghai Jiaotong Univ, 2011(2): 69–74

[7] Gao W, Nan TG, Tan GY, *et al*. Development of a sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of cadmium ions in water, soil and rape samples [J]. Food AgricImmunol, 2012, 23(1): 27–39.

[8] Kumaday, Katoh S, Imanaka H, *et al*. Development of a one-step ELISA method using an affinity peptide tag specific to a hydrophilic polystyrene surface [J]. J Biotechnol, 2007, 127(2): 288–299.

[9] Wu XL, Yu SJ, Kang KR, *et al*. Development of a monoclonal antibody-based indirect competitive immunesorbent assay for 4(5)-methylimidazole detection in caramels [J]. Food Chem, 2015, 170: 354–359.

[10] 陈波, 何庆华, 许杨. 小分子物质的非竞争免疫分析方法最新研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(15): 310–314.
Chen B, He QH, Xu Y. Latest progress on noncompetitive immunoassayfor small molecules substances [J]. Food Sci, 2014, 35(15): 310–314

[11] 陈林, 吴青, 潘科, 等. 农药分子半抗原合成的研究进展[J]. 现代农药, 2005, 4(3): 10–14.
Chen L, Wu Q, Pan K, *et al*. Research progress onhapten synthesis of pesticide molecular [J]. Mod Agrochem, 2005, 4(3): 10–14

[12] Plana E, Moreno MJ, Montoya, *et al*. Development and application of recombinant antibody-based immunoassays to tetraconazole residue analysis in fruit juices [J]. Food Chem, 2014, 143: 205–213.

[13] Won-Ki M, Dae-Hyuk K, Kyungmoon P, *et al*. Characterisation of monoclonal antibody against aflatoxin B1produced in hybridoma 2C12 and its single-chain variable fragment expressed in recombinant *Escherichia coli* [J]. Food Chem, 2011, 126: 1316–1323

[14] María-José M, Plana E, Juan JM, *et al*. Comparative study of monoclonal and recombinant antibody-based immunoassays for fungicide analysis in fruit juices [J]. Food Anal. 2014, 7: 481–489

[15] Kontermann R, DubelS. Antibody engineering volume 2 [M]. Springer Heidelberg Dordrecht London New York: Springer, 2010: 1–589

[16] Kolosova Y, Parka JH, Eremin SA, *et al*. Comparative study of three immunoassays based on monoclonal antibodies for detection of the pesticide parathion-methylinreal samples [J]. Anal ChimActa, 2004, 511(2): 323–331.

[17] Kim HJ, Shelver WL,Li QX, *et al*. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid [J]. Anal ChimActa, 2004, 509: 111–118

[18] 吴璟, 罗林, 肖治理, 等. 直接竞争酶联免疫法测定食品中的丙烯酰胺含量[J]. 分析化学, 2014, 42(8): 1149–1154.
Wu J, Luo L, Xiao ZL, *et al*. Direct competitive enzyme-linked immunoassay for determination of acrylamide in food [J]. Anal Chem, 2014, 42(8): 1149–1154

[19] 李瑞婷, 陆建超, 王弘, 等. 直接竞争酶联免疫吸附法用于糖浆类保健食品中西地那非检测的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 24: 84–95
Li RT, Lu JC, Wang H, *et al*. Development of direct competitive enzyme-linked immunoassay for sildenafil analysis in health food [J]. Sci Tech Food Ind, 2014, 24: 84–95

[20] Guan D, Li PW, Zhang Q, *et al*. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based competitive enzyme immunoassay for aflatoxin M1 in milk and infant milk products [J]. Food Chem, 2011, 125: 1359–1364

[21] Li YS, Luo XS, Yang, *et al*. High specific monoclonal antibody production and development of an ELISA method for monitoring T-2 toxin in rice [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(7): 1492–1497.

[22] Miguel AP, Isabel G; Rosario M, *et al.* Competitive direct ELISA based on a monoclonal antibody for detection of Ochratoxin A in dried fig samples [J]. Food Agric Immunol, 2012, 23(1): 83–91.

[23] Ling SM, Pang J, Yu JJ, *et al*. Preparation and identification of monoclonal antibody against fumonisin B-1 and development of detection by Ic-ELISA [J]. Toxicon, 2014, 80: 64–72.

[24] Cui YL, Liu KC, Xu C. Development of a sensitive monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunesorbent assay for analysingchlorantraniliprole residues [J]. Food Chem, 2014, 143: 293–299.

[25] Raul GF, J-Pablo S, Francisco SB, *et al*. Rapid method based on immunoassay for determination of paraquat residues in wheat, barley and potato [J]. Food control, 2014, 41: 193–201

[26] Yuan YL, Hua XD, Li M, *et al*. Development of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the monoclonal antibody for the detection of benzothiostrobin residue [J]. RSC Adv, 2014, 46(4): 24406–24411

[27] Hua XD, Liu XF, Yin W, *et al*. A sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bifenthrin in a chemical soil barrier [J]. Sci Total Environ, 2015, 502: 246–251.

[28] Fumiko O, Yuki H, Yukie YM, *et al*. Development of direct competitive ELISA for residue analysis of fungicide chlorothalonil in vegetables [J]. Food Hyg Safe Sci, 2014, 55(2): 65–72.

[29] Wang YZ, Yang H, Michael P, *et al*. Highly sensitive and specific determination of mercury (Ⅱ) ion in water, food and cosmetic samples with an ELISA based on a novel monoclonal antibody [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(9): 2519–2528.

[30] Chen XF, Li RF, Liu SZ. Development of enzyme linked immunoassay with high specificity to clenbuterol [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(6): 940–943.

[31] Lei YC, Tai YT, Hsieh KH, *et al*. A polyclonal antibody-based immunoassay for determination of growth stimulant ractopamine: comparative study with recent advances in immunoassay methods [J]. Vet J, 2013, 39(4): 212–224.

[32] Cao BY, He GZ, Yang H. Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of phenylethanolamine A in tissue and feed samples and confirmed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Talanta, 2013, 115: 624–630.

[33] Zhang MC, Wang Y, Yu XN, *et al*. Rapid monitoring of dicyclohexyl phthalate in foods using the direct competitive ELISA [J]. Food Agric Immunol, 2014, 25(2): 229–242.

[34] Celia SP, Francesc AET, Josep VM, *et al*. Development and validation of a direct competitive monoclonal antibody-based immunoassay for the sensitive and selective analysis of the phytoregulatorforchlorfenuron [J]. Anal BioanalChem, 2012, 403(7): 2019–2026.

[35] Feng HY, Tong X, Li WL, *et al*. Indirect competitive enzyme-linked immune sorbent assay of tris-(2,3-dibromopropyl) isocyanurate with monoclonal antibody [J]. Talanta, 2014, 128: 434–444.

[36] Supattra L, Juraithip W. Development of indirect competitive ELISA for quantification of mitragynine in Kratom (Mitragynaspeciosa(Roxb.) Korth.) [J]. Forensic Sci Int, 2014, 224: 70–77.

[37] Gonzalez-Techera A,Vanrell L, Last JA, *et al*. Phage anti-immune complex assay: general strategy for noncompetitive immunedetection of small molecules [J]. Anal Chem, 2007, 79(20): 7799–7806.

[38] Yuko H, Dong JH, Hiroshi U, *et al*. Open-sandwich immunoassay for sensitive and broad-range detection of a shellfish toxin gonyautoxin [J]. Anal ChimActa, 2013, 793: 107–113.

[39] Masaki I, Amane Y, Wu YS, *et al*. Amicro OS-ELISA: rapid noncompetitive detection of a small biomarker peptide by open-sandwich enzyme-linked immunesorbent assay (OS- ELISA) integrated into microfluidic device [J]. Roy Soc Chem, 2010, 10(1): 92–100.

[40] Dong JX, Xu C, Wang H, *et al*. Enhanced sensitive immunoassay: noncompetitive phage anti-immune complex assay for the determination of malachite green and leucomalachite green [J]. Agric Food Chem, 2014, 62, 8752–8758.

[41] Mariana C, Gabriel L, Martin R, *et al*. Recombinant streptavidin nanopeptamer anti-immunocomplex assay for noncompetitive detection of small analytes [J]. Anal Chem, 2014, 86: 10467–10473.

[42] Tsvetomira I, Tzonka G, *et al*. Sensitive progesterone determination using a magnetic particle-based enzyme-linked immunosorbentassay [J]. Anal Lett, 2015, 48(5): 843–860

[43] 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): 208–211.
Guan D, Pan CP, Wang W, *et al*. Development of a magnetic particle based enzyme-linked immunosorbent assay for determining fumonisin B1 in corn [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 208–211

(责任编辑: 李振飞)

作者简介

詹屋强, 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 1575644714@qq.com

王　弘, 教授, 博士, 主要研究方向为食品安全与营养。
E-mail: gzwhonggd@163.com