

基于新型量子点荧光微球的氯霉素免疫层析试纸条的制备和应用

丁乔棋 李 丽 范文韬 吕亚楠 胡建华 闫丽萍* 宋素泉*

(南京农业大学动物医学院,南京 210095)

摘 要 以羧基化 CdTe/ZnSe 量子点荧光微球为标记物,通过 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺/*N*-羟基琥珀酰亚胺(EDC/NHS)活化法将氯霉素(CAP)单克隆抗体与量子点荧光微球偶联制备荧光探针。氯霉素全抗原(CAP-HS-BSA)及羊抗鼠二抗分别喷涂硝酸纤维素膜,形成检测线(T 线)和质控线(C 线),组装成新型氯霉素量子点荧光微球免疫层析试纸条,建立了快速、定量检测牛奶中 CAP 的方法。本研究开发的量子点荧光微球试纸条可在 15 min 内完成牛奶样品中 CAP 的定量检测,线性范围为 0.1 ~ 100.0 μg/L,检出限为 0.1 μg/L。牛奶样品 CAP 的加标回收率为 93.3% ~ 97.9%,相对标准偏差在 4.9% ~ 6.9% 之间。

关键词 氯霉素;量子点微球;免疫层析试纸条

1 引言

氯霉素(Chloramphenicol, CAP)是一种价格低廉、高效广谱的抗生素,曾经广泛应用于畜牧业生产中。然而,由于其分子结构中带有毒性硝基基团且半衰期较长,极易残留在畜禽体内产生毒副作用,残留的 CAP 还可以通过食物链危害消费者健康^[1,2]。目前,许多国家都禁止在畜牧生产中使用 CAP,如欧盟规定氯霉素在肉、海鲜、鸡蛋、牛奶、蜂蜜等食用动物内的最小执行限量(MRPL)为 0.3 μg/kg^[3]。我国农业部 235 号公告中明确规定禁止使用 CAP^[4]。然而,CAP 的滥用问题仍非常严重,CAP 残留超标时有发生,因此加强动物性食品中 CAP 的监测非常重要。

目前,检测 CAP 的常用方法包括微生物测试法、ELISA 法及液相色谱分析法等^[5]。微生物法操作简便但灵敏度不高^[6];ELISA 灵敏度较好,但常存在假阳性,且耗时较长^[7];色谱分析法具有良好的灵敏度、准确性与重复性,但样品前处理过程繁琐、费用高且对需要专门的操作人员^[8]。而免疫层析技术成本低、检测速度快、操作简单、对设备要求低且适合现场应用,已广泛用于食品安全的现场筛查^[9]。目前常用的免疫层析技术的标记物为胶体金^[10],通常通过肉眼观察进行定性分析,检测结果受主观影响大,不适于进行定量分析。相比之下,采用荧光标记的免疫试纸条显示出更高的灵敏度,适于样品的定量分析。如 Song 等^[11]采用镧系元素 Eu(III)-BHHCT 修饰的荧光纳米材料二氧化硅为探针,建立了猪尿中盐酸克伦特罗的免疫层析检测方法,检出限为 3.7 μg/L,灵敏度高于胶体金免疫层析试纸条。

量子点(Quantum dots, QDs)是目前常用的一种荧光标记物,是由 II ~ VI 族或 III ~ V 族元素组成的新型荧光纳米材料。与传统有机染料相比,QDs 具有一元激发多元发射、激发光谱宽、发射光谱窄、光稳定性好和抗漂白能力强等特点,因此采用量子点标记的免疫层析试纸条具有相对较高检测的灵敏度^[12~14],而将大量 QDs 包裹于聚合物材料制备得到的量子点微球(Quantum dot submicrobeads, QBs)则可表现出更高的荧光强度和更好的光学稳定性^[15,16]。目前,以 QBs 为探针的氯霉素免疫层析试纸条尚未见报道。本研究采用 CdTe/ZnSe QBs 标记的抗 CAP 单克隆抗体为指示物,开发出一种特异性检测 CAP 的 QBs 荧光免疫层析试纸条,并应用于实际牛奶样品中 CAP 的检测,显示出良好的实用性。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HSC-24A 氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Gel

2017-05-09 投稿;2017-09-04 接受

本文系国家重点研发计划(Nos. 2016YFD0501200, 2016YFD0501009)、中央高校基本业务费(No. Y0201500195)、江苏省自然基金面上项目(No. BK20161452)、广东省科技计划重点项目(No. 2017B020202010)和江苏高校优势学科建设工程资助项目资助

* E-mail: yanliping@njau.edu.cn; suquan.song@njau.edu.cn

Doc XR 凝胶成像系统(美国 Bio-rad 公司); 硝酸纤维素膜(NC 膜)、玻璃纤维素膜、滤纸(美国 Millipore 公司); 表面羧基化修饰的 CdTe/ZnSe 量子点微球(QBs, 上海艾信生物科技公司), 平均粒径为 174 nm, 激发波长为 365 nm 时的最大发射波长为 610 nm; 氯霉素标准品(北京百灵威科技公司); 胎牛血清蛋白(BSA)、羊抗鼠二抗、2-(*N*-吗啡啉)乙基磺酸(MES)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)(北京索莱宝生物科技公司); 琥珀酸酐(HS, 上海源叶生物公司); 吡啶(南京化学试剂股份有限公司); 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(碳二亚胺, EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺钠盐(Sulfo-NHS)(上海麦克林生化科技有限公司); CAP 单克隆抗体由本实验室免疫合成, 效价为 1×10^5 。氯霉素 ELISA 检测试剂盒(上海生工生物工程公司)。

2.2 氯霉素全抗原的制备

采用 EDC 法制备氯霉素全抗原^[17], 具体过程如下: 称取 HS 930 mg 置于平底烧瓶, 加入 8 mL 丙酮, 1.5 mL 吡啶, 60℃ 水浴加热搅拌至澄清, 记为 A 液; 称取 2 g CAP, 溶于 5 mL 丙酮中, 记为 B 液; 将 B 液逐滴加到 A 液中, 60℃ 回流 2 h 后加丙酮并吹干。体系中加入 30 mL 乙酸乙酯和 10 mL 0.1 mol/L HCl, 振荡去除酸层, 用蒸馏水洗两次。随后向乙酸乙酯层中加入 10% (*w/w*) NaHCO₃, 搅拌使其溶解, 用浓 HCl 调至 pH 3, 得到黄色粘稠的半抗原氯霉素琥珀酸酯(CAP-HS)。CAP-HS 经高效液相色谱法(HPLC)鉴定后, 冻干保存。称取 150 mg CAP-HS, 溶于 2.5 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)中, 依次加入适量 MES 缓冲溶液、EDC 溶液和 Sulfo-NHS 溶液后, 室温下搅拌反应 3 h, 随后加入 20 mg/mL BSA, 室温避光搅拌反应 3 h, 然后 4℃ 下搅拌过夜。最后用 0.05 mol/L 硼酸缓冲液透析纯化, 得到偶联物 CAP-HS-BSA。HPLC 分析条件为: 流动相为甲醇-乙腈-乙酸铵溶液(pH 6.8, 0.05 mol/L) (0.2:19.8:80, V/V), 流速为 0.5 mL/min, 分析温度 30℃, SPD-20A 紫外检测器, 检测波长 276 nm。

2.3 量子点微球标记氯霉素单克隆抗体

采用 EDC-NHS 法^[18]偶联 QBs 和 CAP 抗体: 将 10 mg QBs 加入到 4 mL MES(0.1 mol/L, pH 5.5) 缓冲液中入, 混匀, 20000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入 1 mL MES 缓冲液重悬。体系中分别加入 10 mg/mL 的 EDC 和 sulfo-NHS 溶液, 37℃ 振荡反应 1 h 后, 20000 r/min 离心 15 min, 沉淀加入 1 mL HEPES 缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.4)重悬。将 CAP 抗体加入到上述溶液中, 37℃ 反应 2 h, 然后加入含有 10% BSA 的 PBS 溶液封闭 2 h, 得到量子点荧光微球标记的 CAP 单抗(简称 QBs 探针), 4℃ 储存, 备用。

2.4 QBs 免疫标记快速检测试纸条的组装及结果判读

QBs 荧光试纸条由样品垫、结合垫、NC 膜、吸水纸及 PVC 底板 5 部分组成, 如图 1A 所示。将适当浓度的氯霉素全抗原及羊抗鼠二抗喷涂在 NC 膜上, 分别作为检测线(T 线)和质控线(C 线), 结合垫上包被 QBs 探针。将 NC 膜、结合垫、样品垫及吸水纸依次粘贴在 PVC 底板上, 相互重叠 0.2 mm。组装好后切成 4 mm 条状试纸条, 置于锡箔袋中, 加入干燥剂密封保存, 备用。使用时, 将待测样品滴加到样品垫上, 样品在虹吸作用下缓慢向吸水纸方向迁移。当样品中没有 CAP 时, QBs 探针就会与包被在 T 线上的 CAP 全抗原结合而出现荧光条带, 剩余的 QBs 探针继续向前移动, 被 C 线上的二抗捕获, C 线也发出荧光; 当样品液中含有 CAP 时, 结合垫上 QBs 荧光探针会和 CAP 结合, 因此在 T 线处与 CAP 全抗原结合的 QBs 探针的量就会减少, T 线处荧光强度变弱或消失, 即 T 线的荧光强度和 CAP 的量成反比。无论样品中是否含有 CAP, C 线都应出现荧光条带, 否则试纸条结果判定为无效。反应后的试纸条可通过 Gel Doc XR 成像系统读取 C 线和 T 线上的荧光强度值(C 值和 T 值), 用于定量检测。试纸条结果示意图如图 1B 所示。

2.5 QBs 荧光试纸条性能评价

在优化条件下, 采用本试纸条对含有不同浓度 CAP 的牛奶样品进行检测, 通过凝胶成像系统读取试纸条的 T 值和 C 值, 每个浓度重复 3 次, 并以 CAP 的浓度为横坐标, 以 B/B_0 (不同 CAP 浓度测得的 T/C 值与 CAP=0 时测得的 T/C 值的比值) 为纵坐标, 绘制拟合曲线。

考察结构类似物氟苯尼考、甲砒霉素、青霉素和莱克多巴胺(1000 μg/L)在试纸条上的显色情况, 以 PBS 作为空白对照, 分析试剂条的特异性。制备的荧光试纸条封闭在含有干燥剂的铝箔袋中, 37℃ 下保存, 2 周后随机取出数根试纸条, 测定梯度浓度的 CAP 标准溶液, 分析试纸条的稳定性。

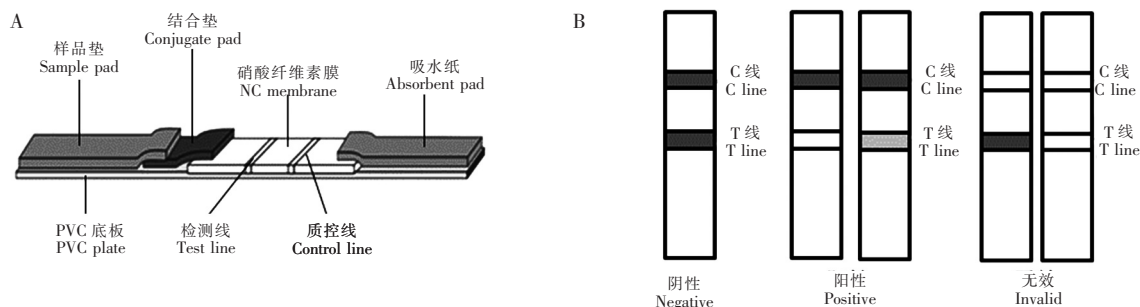


图 1 QBs 荧光试纸条检测氯霉素的原理图。(A) 试纸条组装结构图; (B) 试纸条结果示意图

Fig. 1 Schematic illustration of quantum dot submicrobeads (QBs)-based immunochromatographic test strip (ICTS) for chloramphenicol (CAP) detection: (A) structure of QBs-based ICTS; (B) schematic diagram of CAP detection by QBs-based ICTS

2.6 实际牛奶样品分析

通过在阴性牛奶中的加标回收实验,评价 QBs 荧光试纸条的准确性以及精密度,加标浓度为 0.1 和 10 $\mu\text{g/L}$ 。为了进一步评价开发的 QBs 荧光试纸条的实用性,研究分析了 30 份加标牛奶样品(10 份牛奶加标浓度为 0.1 $\mu\text{g/L}$,10 份牛奶加标浓度为 10 $\mu\text{g/L}$,其余 10 份为阴性对照),并将实验结果与商品化 ELISA 试剂盒的检测结果进行对比。

3 结果与分析

3.1 半抗原 CAP-HS 和全抗原 CAP-HS-BSA 的鉴定

采用 HPLC 分析半抗原 CAP-HS 的合成效果。结果表明,CAP 色谱峰保留时间为 8.0 min(图 2A),CAP-HS 的保留时间为 9.5 min(图 2B)。BSA (500 $\mu\text{g/mL}$)、CAP-HS-BSA (500 $\mu\text{g/mL}$) 及 CAP-HS (50 $\mu\text{g/mL}$) 在 220 ~ 340 nm 范围内的紫外光谱图如图 2C 所示,CAP-HS-BSA 和 BSA 在 280 nm 左右均有一个吸收峰,但是相同蛋白浓度的 CAP-HS-BSA 在 280 nm 的吸光值是 BSA 吸光值的数倍,这是由于 BSA 与 CAP-HS 偶联后吸光值叠加的缘故,因此可以初步判定 CAP-HS 与 BSA 偶联成功。SDS-PAGE 凝胶电泳分析(图 2D)也显示,CAP-HS-BSA 的电泳条带滞后于蛋白标准品 BSA,说明全抗原 CAP-HS-BSA 合成成功。

3.2 QBs 荧光探针制备条件的优化

本研究通过将适量的 QBs 荧光探针溶液滴加在试纸条的结合垫上(试纸条的 NC 膜只包被有 C 线),根据 C 线的荧光情况选出制备 QBs 荧光探针的最佳条件。当 pH 7.5 时,C 线上 QBs 探针-二抗偶联物的荧光强度最强,随着 pH 值升高,C 线荧光强度下降(见图 3A),原因可能是 pH 值过高导致蛋白变性,从而导致 QBs 与单抗偶联效率降低^[19]。在其它条件相同的情况下,当加入 EDC 和 Sulfo-NHS 偶联剂的量不足时,QBs 与 CAP 抗体偶联不完全,当偶联剂的加入量为 150 μL 时,QBs 探针-二抗偶联物的荧光强度最强(图 3B)。考察了 QBs 与抗体的质量比对试纸条的荧光效果的影响(图 3C)。结果表明,当 QBs 与抗体(1 mg/mL)的质量比为 7.5:1.0 时,获得的 QBs 探针与二抗作用荧光效果最好。由图 3D 可见,QBs 与抗体偶联前后 QBs 的峰型保持对称,半峰宽不变,且均无拖尾现象,表明二者粒径分布均匀,分散性好,荧光性能良好。另外,QBs 和 CAP 单抗结合后表现出更高的荧光强度,其荧光值由原来的 264.128 a.u 升高至 284.546 a.u。

3.3 实验条件优化

3.3.1 NC 膜、QBs 探针浓度以及测试时间的选择 比较了两种 NC(Satorius CN140 NC 膜和 TEST G-140 NC 膜)组装的试纸条的检测效果(图 4A, 4B)。结果表明,加入 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ CAP 标准品后 15 min,随 CAP 浓度的增加,前者测得 T/C 值呈明显的梯度下降趋势,且荧光强度更亮;而由后者组装的试纸条则变化不明显。因此,本研究采用 Satorius CN140 NC 膜组装 CAP 荧光试纸条。

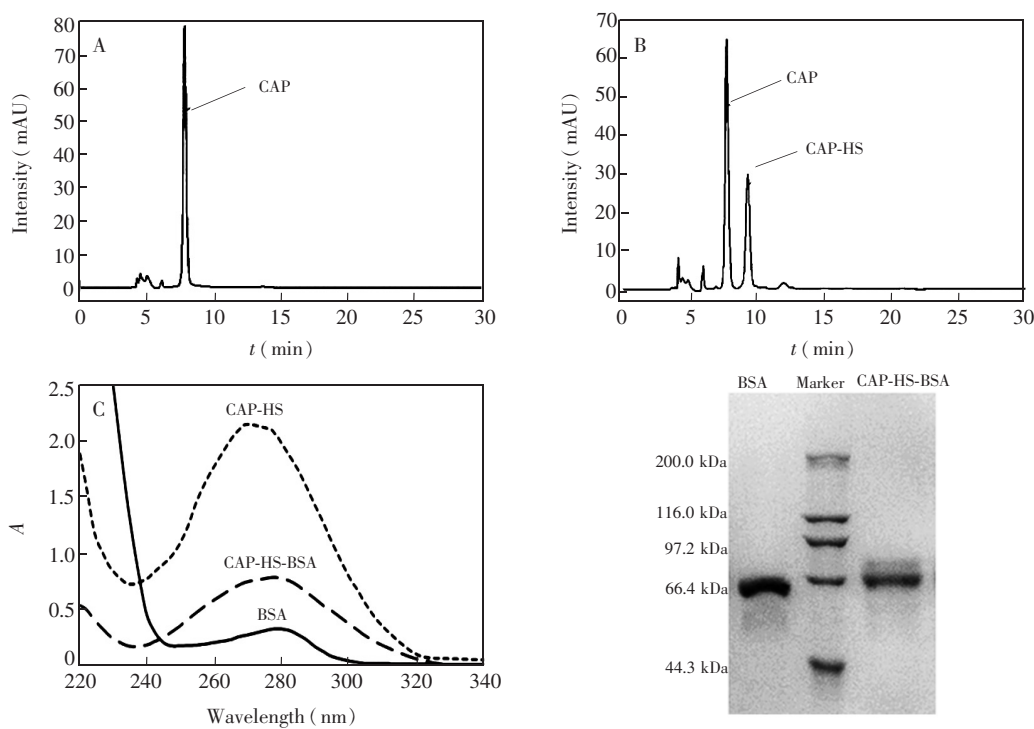


图2 氯霉素半抗原 CAP-HS 及全抗原 CAP-HS-BSA 鉴定。(A) CAP 标准品的高效液相色谱图；(B) CAP-HS 高效液相色谱图；(C) CAP-HS-BSA, CAP-HS 以及 BSA 的紫外光谱图；(D) CAP-HS-BSA 与 BSA 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 Identification of CAP-HS and CAP-HS-BSA. (A) HPLC analysis of CAP; (B) HPLC analysis of CAP-HS; (C) UV spectra of CAP-HS-BSA, CAP-HS and BSA; (D) SDS-PAGE electrophoretogram of CAP-HS-BSA and BSA. HS, succinic anhydride; BSA, bovine serum albumin; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

使用2倍稀释的 QBs 探针组装的试纸条(喷涂量2 μL/cm)检测含有 CAP 的样品时,获得的 T/C 值明显高于3倍稀释的 QBs 探针,因此本研究最终选择2倍稀释的 QBs 探针包被试纸条的结合垫(见图4C)。

免疫层析试纸条的显色是抗原抗体免疫学动态反应过程,为了优化反应时间,本研究考察了试纸条检测1 μg/L CAP 浓度时 T/C 值随时间的变化,加入待测样品后,通过成像系统每隔5 min 记录试纸条 T 线和 C 线荧光强度(图4D,插图为不同免疫反应时间下的 S/N 值)。结果表明,在30 min 内,空白对照组和阳性组的 T/C 值变化不明显,在15 min 时, S/N 值(相同时间点下对照组和阳性组的 T/C 值的比值)达到最大,随着时间延长, S/N 值逐渐降低, NC 膜上的非特异性结合增强使背景颜色加深,故选择15 min 为试纸条的最佳分析时间。

3.3.2 T 线抗原及 C 线二抗喷涂浓度的优化 由表1可知,固定 C 线喷涂的二抗含量,试纸条 T 线的荧光强度随 T 线上抗原的浓度增加而加强, T/C 值也随着抗原浓度的加大而增加;当固定 T 线上抗原的量为0.6 mg/mL 时,试纸条 C 线的荧光强度随着二抗浓度的加大而增强。第4、5和8、9组中,虽然 T 线和 C 线的荧光强度随着抗原或二抗的浓度增加而增加,但抑制率偏低;第6组中,包被的二抗浓度为0.2 mg/mL 时,检测到 C 线值偏低;而第7组实验中,当 T 线抗原的喷涂量浓度为0.6 mg/mL、C 线上二抗的喷涂浓度为0.4 mg/mL 时,试纸条 T 线和 C 应的荧光强度值最佳,且 T/C 值也较高, CAP 阳性实验中竞争抑制率为42%,因此选用该组浓度喷涂试纸条的 T 线和 C 线。

3.4 QBs 试纸条的检测性能

采用CAP阴性的牛奶样品配制CAP系列标准溶液检测 QBs 试纸条的灵敏度及检测范围。由图5

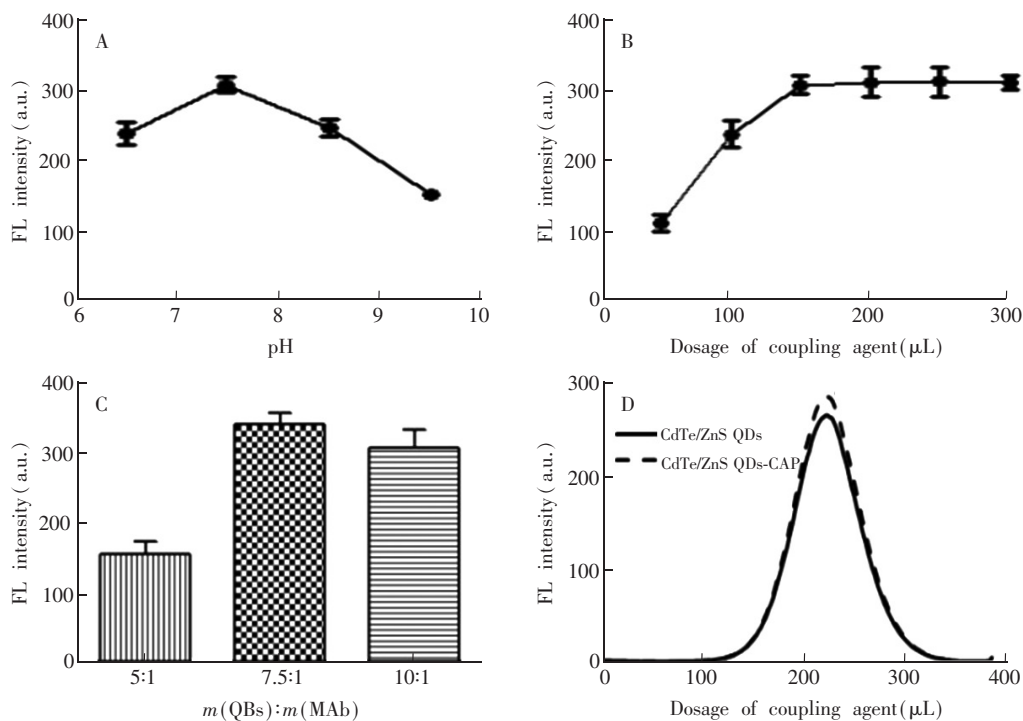


图3 QBs 荧光探针制备条件的优化。(A) pH 的影响; (B) 偶联剂 EDC-NHS 剂量的影响; (C) 抗体量的影响; (D) QBs 偶联前后荧光光谱图。

Fig. 3 Optimization of synthesis conditions of QBs-probe. (A) Effect of pH; (B) Effect of dosage of coupling agent; (C) Effect of the dosage of CAP monoclonal antibodies (mAb); (D) Fluorescence spectra of CdTe/ZnSe QBs and CdTe/ZnSe QBs-mAb/CAP. EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide; NHS, *N*-Hydroxysuccinimide

表 1 T 线抗原及 C 线二抗喷涂浓度的优化($n=3$)
Table 1 Optimization of concentration of CAP-HS-BSA sprayed on T-line and secondary antibody on C-line ($n=3$)

组别 Groups	抗原喷涂浓度 Concentration of CAP-HS-BSA (mg/mL)	二抗喷涂浓度 Concentration of GaMIgG (mg/mL)	T 线荧光强度 FL intensity of T-line	C 线荧光强度 FL intensity of C-line	T/C 值 T/C value	竞争抑制率 $1-(B/B_0)$ Inhibition rate ($1-B/B_0$)
1	0.2	1	437±14	27540±33	0.0159±0.12	0.46±0.02
2	0.4	1	485±74	29312±42	0.0165±0.06	0.44±0.06
3	0.6	1	497±32	24997±10	0.0199±0.15	0.46±0.03
4	0.8	1	508±28	26210±72	0.0194±0.09	0.34±0.11
5	1	1	607±22	21102±12	0.0288±0.24	0.30±0.08
6	0.6	0.2	412±11	2342±53	0.1761±0.18	0.38±0.05
7	0.6	0.4	440±45	10182±49	0.0432±0.32	0.42±0.14
8	0.6	0.6	265±8	16442±36	0.0181±0.14	0.14±0.04
9	0.6	0.8	445±28	20460±27	0.0170±0.06	0.27±0.07

注:CAP 浓度为 0.1 μg/L, B 和 B_0 分别为 CAP 存在和不存在时的 T/C 值。
Note: Concentration of CAP is 0.1 mg/mL. B and B_0 are T/C values in the presence and absence of CAP, respectively. GaMIgG, goat anti-mouse immunoglobulin

可知,随着牛奶中 CAP 含量增加,T 线的荧光强度则逐渐变浅直至完全消失,当 CAP 的浓度为 0.1 μg/L 时,试纸条 T 线的荧光强度明显弱于阴性对照组的 T 线,因此以 0.1 μg/L 为试纸条的检出限(图 5A)。从图 5B 可知,检测 CAP 的浓度范围为 0.1 ~ 100.0 μg/L, QBs 荧光试纸条的拟合曲线为 $\lg y = -0.8103 - 0.6115 \lg x, R^2 = 0.9915$ 。

3.5 荧光免疫试纸条的特异性和稳定性

分别选择氟苯尼考、甲矾霉素、莱克多巴胺、青霉素 4 种抗生素(浓度为 1000 μg/L)评价 QBs 荧光

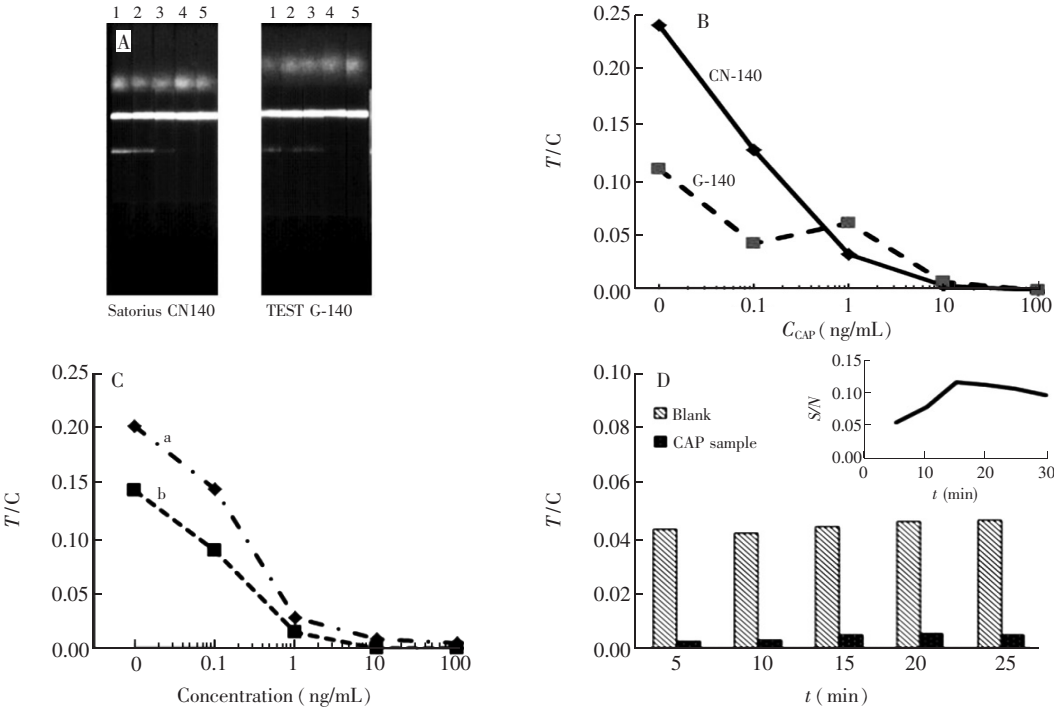


图4 QBs 试纸条制备条件的优化。(A) 两种 NC 膜的显色效果；(B) 两种 NC 膜上 CAP 对应的 T/C 值；(C) QBs 优化图,曲线 a 和 b 分别为 QBs 探针 2 倍和 3 倍稀释后测试氯霉素溶液所对应的 T/C 值；(D) 试纸条的 T/C 值随反应时间的变化图,插图为不同反应时间下的 S/N 值,CAP 浓度为 1 μg/L。

Fig.4 Optimization of immunochromatographic strip test (ICST). (A) Chromogenic result of two kinds of nitrocellulose (NC) membranes. (B) Fluorescence intensity ratio of test line (T line) and C-line (C line) (T/C value) of ICST with two kinds of NC menmbrenas . (C) Effect of concentration of QBs-probe on T/C value of ICST. (D) Effect of immunoreaction time on T/C value of ICST, Inset is the chang of signal to noise ration (S/N) value along with immunoreaction time. Concentraion of CAP is 1 μg/L

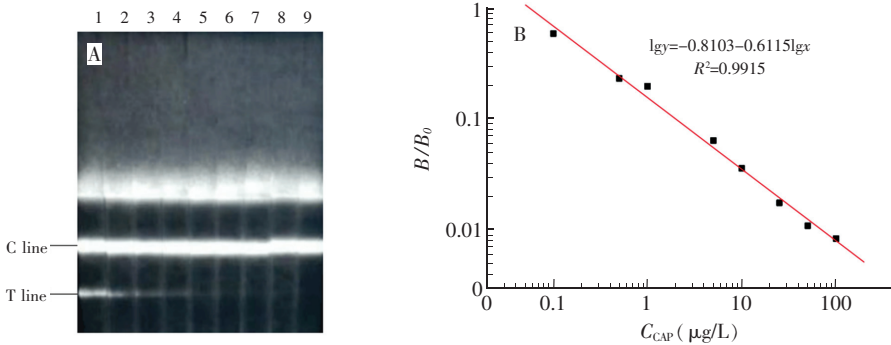


图5 试纸条的性能评价。(A) 试纸条灵敏度实验,1~9 CAP 浓度分别为:0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、25.0、50.0 和 100.0 μg/L；(B) 试纸条的拟合曲线。

Fig.5 Evaluation of property of ICST. (A) Sensibility of CAP ICST, the concentration of CAP from 1-9 is 0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 and 100.0 μg/L, (B) Calibration curves of ICST

试纸条的特异性,以 PBS 作为空白对照。结果显示,当试纸条上滴加 4 种抗生素时,其 T 线和 C 线荧光条带与空白对照组基本相同,T/C 值检测结果也证明四种抗生素在试纸条上无交叉反应。通过 37℃ 加速稳定性实验考察试纸条的稳定性,结果表明,在 2 周的保存期内,虽然试纸条的 T 线和 C 线荧光强度值有所减弱,但试纸条的 T/C 值的相对标准偏差(RSD)为 2.3%~7.0%,检测性能未发生明显变化。因此,本研究制备的 QBs 荧光试纸条具有良好的特异性和稳定性。

3.6 实际样品分析

阴性牛奶样品两个浓度水平(0.1 和 10.0 $\mu\text{g/L}$)的加标回收率分别为 97.9% 和 93.3%, $\text{RSD}<7\%$ ($n=5$)。因此,本研究制备的 QBs 荧光试纸条具有良好的特异性和稳定性,其准确性和精密度可以满足快速定量筛查的需求。

采用 CAP QBs 荧光试纸条检测 30 个牛奶样品的结果表明,20 份加标样品中,19 份样品的检测结果为阳性;10 份阴性样品的检测结果皆为阴性,而且本实验结果与商品化 ELISA 检测试剂盒的检测结果一致。与 ELISA 方法相比,QBs 荧光试纸条法操作更为简单,检测时间仅需 15 min。与常规胶体金试纸条法($\text{LOD}: 0.2 \sim 2.0 \mu\text{g/L}$)^[20,21]相比,CAP QBs 荧光试纸条具有更高的检测灵敏度和更强的特异性,可实现目的分子的定量分析,显示出良好的应用前景。

References

- 1 Fraunfelder F T, Bagby G C, Kelly D J. *Am. J. Ophthalmol.*, **1982**, 93(3): 420–422
- 2 Kucers A. *J. Antimicrob. Chemother.*, **1980**, 6(1): 1–4
- 3 Samanidou V, Kehagia M, Kabir A, Furton K G. *Analy. Chim. Acta*, **2016**, 914: 62–74
- 4 WU Li-Yuan. *The Chinese Livestock and Poultry Breeding*, **2014**, 10(4): 43–44
吴丽媛. 中国畜禽种业, **2014**, 10(4): 43–44
- 5 YANG Cheng-Dui, SONG Li-Hui, MAO Li-Ha, LIU Mi-Xin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2004**, 32(7): 905–907
杨成对, 宋莉晖, 毛利哈, 刘密新. 分析化学, **2004**, 32(7): 905–907
- 6 Schwarm E F, Dabner C, Wilson J W, Boghosian M P. *J. Pharmaceut. Sci.*, **1966**, 55(7): 744–745
- 7 Anna Y K, Jeanne V S, Alexey M. Egorov. *Food Agri. Immunol.*, **2000**, 12: 115–120
- 8 ZHANG Xiao-Jun, ZHENG Bin. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, **2010**, 29(6): 115–118
张小军, 郑斌. 分析实验室, **2010**, 29(6): 115–118
- 9 Huang X, Aguilar Z P, Xu H, Lai W, Xiong Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 75: 166–180
- 10 Sakamoto S, Yusakul G, Nuntawong P, Kitisripanya T, Putalun W, Miyamoto T, Tanaka H, Morimoto S. *J. Chromatogr. B*, **2017**, 1048: 150–154
- 11 Song C, Zhi A, Liu Q, Yang J, Jia G, Shervin J, Tang L, Hu X, Deng R, Xu C, Zhang G. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 50: 62–65
- 12 Wang C, Hou F, Ma Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 68: 156–162
- 13 Taranova N A, Berlina A N, Zherdev A V, Dzantiev B B. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 63(2): 255–261
- 14 Di Nardo F, Anfossi L, Giovannoli C, Passini C, Gofman V V, Goryacheva I Y, Baggianic C. *Talanta*, **2016**, 150: 463–468
- 15 DUAN Hong, CHEN Xue-Lan, JIANG Hu, SHEN Jun, DONG Sheng-Ming, XIONG Yong-Hua, Andrew Wang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(3): 338–343
段宏, 陈学岚, 江湖, 沈骏, 董胜明, 熊勇华, Andrew Wang. 分析化学, **2015**, 43(3): 338–343
- 16 ZHOU Yao-Feng, XIONG Si-Cheng, JIANG Hu, DUAN Hong, XIONG Yong-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43(12): 1837–1843
周耀峰, 熊斯诚, 江湖, 段宏, 熊勇华. 分析化学, **2015**, 43(12): 1837–1843
- 17 Campbell G S, Mageau R P, Schwab B, Johnston R W. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1984**, 25(2): 205–211
- 18 Kolosova A Y, Samsonova A M. *Food Agri. Immunol.*, **2000**, 12(2): 115–125
- 19 WANG Hong-Jiang, LIU Ting, XIE Ji, LI Wan-Yuan, GUO Ai-Ling, CAI Zhao-Xia. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(5): 632–637
王洪江, 柳婷, 谢跻, 栗婉媛, 郭爱玲, 蔡朝霞. 分析化学, **2010**, 38(5): 632–637
- 20 XU Sheng-Nan, YU Qiong-Wei, YUAN Bi-Feng, FENG Yu-Qi. *Journal of Analytical Science*, **2016**, 32(4): 471–474
许胜男, 余琼卫, 袁必锋, 冯钰琦. 分析科学学报, **2016**, 32(4): 471–474
- 21 XIAO Zhi-Li, ZENG Wen-Liang, WANG Hong, SHEN Yu-Dong, SUN Yuan-Ming, YANG Jin-Yi. *Food & Machinery*, **2013**, 29(4): 54–58
肖治理, 曾文亮, 王弘, 沈玉栋, 孙远明, 杨金易. 食品与机械, **2013**, 29(4): 54–58

