

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250226001

引用格式: 陈峰, 钟恩德, 明小天, 等. 酶联免疫吸附法检测芸豆中毒相关的大豆凝集素[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(10): 186–191.

CHEN F, ZHONG END, MING XT, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting soybean agglutinin associated with kidney bean poisoning [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(10): 186–191. (in Chinese with English abstract).

酶联免疫吸附法检测芸豆中毒相关的大豆凝集素

陈峰¹, 钟恩德², 明小天¹, 张颖茜^{1*}, 张婧婧³

(1. 南通市疾病预防控制中心, 南通 226007; 2. 青岛市疾病预防控制中心, 青岛 266071;

3. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘要: **目的** 建立豆类食品中大豆凝集素的酶联免疫吸附法检测方法。**方法** 样品经洗净后, 加入磷酸盐缓冲液充分匀浆后, 经离心提纯后, 收集上清液经酶联免疫吸附法测定, 用酶标仪定量。**结果** 在 0–400 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内, 所得大豆凝集素的线性方程为 $Y=0.0021X+0.0528$, $r=0.9998$, 该方法的检出限为 125 mg/kg, 回收率在 99.17%~101.20%之间, 相对标准偏差在 1.27%~2.24%。**结论** 该方法操作简便, 特异性好, 抗原浓度与 OD_{450} 值之间呈正比, 适用于基层疾控中心对大豆凝集素中毒事件的检测。

关键词: 酶联免疫吸附法; 芸豆; 中毒; 大豆凝集素

Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting soybean agglutinin associated with kidney bean poisoning

CHEN Feng¹, ZHONG En-De², MING Xiao-Tian¹, ZHANG Ying-Qian^{1*}, ZHANG Jing-Jing³

(1. Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong 226007, China; 2. Qingdao Center for Disease Control and Prevention, Qingdao 266071, China; 3. Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: Objective To establish an enzyme-linked immunosorbent assay method for detecting soybean agglutinin in legume foods. **Method** After washed the sample, added phosphate buffer solution and homogenize it thoroughly. After centrifugation and purification, collected the supernatant and determine it by enzyme-linked immunosorbent assay. Quantify it used an enzyme-linked immunosorbent assay reader. **Result** In the linear range of 0–400 $\mu\text{g/mL}$, the linear equation of soybean agglutinin obtained was $Y=0.0021X+0.0528$, $r=0.9998$. The detection limit of this method was 125 mg/kg, the recovery rate was between 99.17% and 101.20%, and the relative standard deviation was between 1.27%–2.24%. **Conclusion** This method is easy to operate, has good specificity, and the antigen concentration is directly proportional to the OD_{450} value. Applicable to the detection of soybean agglutinin poisoning incidents by grassroots disease control centers.

KEY WORDS: enzyme-linked immunosorbent assay method; kidney bean; poisoning; soybean agglutinin

收稿日期: 2025-02-26

基金项目: 江苏省重点研发计划项目(社会发展)(BE2023772)

第一作者: 陈峰(1978—), 男, 主任技师, 主要研究方向为理化检验工作。E-mail: lh_cf@163.com

*通信作者: 张颖茜(1987—), 女, 主管技师, 主要研究方向为理化检验。Email: 490120358@qq.com

0 引言

大豆凝集素(soybean agglutinin, SBA)是一种植物凝集素和抗营养因子,食入未煮熟的豆类食品,会致使红细胞彼此黏聚,增加血液黏稠度,从而诱发血栓^[1-2]。根据美国食品和药物管理局的相关通知,4 颗生芸豆就有可能导致严重的恶心、呕吐和腹泻症状。大豆凝集素的常用检测方法有植物性代谢产物大豆凝集素测定酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和转基因生物及其产品食用安全检测抗营养因子大豆中凝集素检测方法液相色谱-串联质谱法、聚合酶链式反应、多种食用豆科植物毒性试验方法联合皂甙定性检测和红细胞凝集实验等^[3-4]。液相色谱-串联质谱法能够对大豆凝集素的测量进行准确定量,利用标准肽一和标准肽二的保留时间和二级谱图(或者子离子)进行定性^[5-7],但其有检测仪器、试剂昂贵,分析过程耗时等缺点。红细胞凝集实验操作条件要求高、且程序较复杂,无法满足突发快速检测和大批日常检测的要求,而 ELISA 法作为分析化学领域的检测方法之一,具有选择性强,检测时间短,成本低,操作方便等优势。

鉴于此,本研究采用双抗体夹心 ELISA 法(见图 1)建立了一种 ELISA 法检测芸豆中毒中的大豆凝集素方法,适用于基层疾控中心对大豆凝集素中毒事件的检测,并在 450 nm 波长下对光密度(optical density, OD)值进行测定。以期在现场处理大豆凝集素的食物中毒事件提高科学依据。

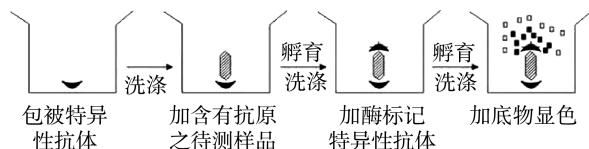


图 1 双抗体夹心 ELISA 法测抗原示意图

Fig.1 Schematic diagram of antigen detection by double antibody sandwich ELISA method

1 材料与方

1.1 仪器、试剂与材料

LA204 电子分析天平(精度 0.1 mg, 常熟百灵电子天平公司); IMARK 酶标仪(伯乐-550 型、450 nm 波长滤光片, 美国 BIO-RAD 公司); MultiFUGE X1R PrimoB 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); HH-2 电热恒温水浴锅(国华仪器制造有限公司); AdvantageA10 Milli-QA 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

大豆凝集素 ELISA 试剂盒(批号: A112664-48T)、大豆凝集素标准品(批号: A112664-48T)(上海抚生实业有限公司); 磷酸盐缓冲溶液(北京兰杰柯科技有限公司); 实验用水都为超纯水。

样品来源某食品店集中供餐采购的芸豆。

1.2 实验方法

1.2.1 原理

采用双抗体夹心 ELISA 法原理: 用待检测的大豆凝集素与已经包被在聚苯乙烯板上的大豆凝集素抗体充分反应, 再加入 HRP 标记的大豆凝集素抗体, 形成抗体-抗原-酶标记抗体复合物, 通过洗板, 洗去多余游离抗体、抗原及杂质, 再加入底物四甲基联苯胺显色, 使测定方法达到较高的敏感度, 反应颜色的深浅与待测的大豆凝集素含量成正比。记录酶标仪在 450 nm 波长处 OD, 配制系列标准溶液后制作相应的标准曲线, 大豆凝集素浓度与 OD₄₅₀ 值之间呈正比, 通过标准曲线可获得样品中大豆凝集素的浓度。

1.2.2 仪器工作条件

仪器工作条件为酶标仪 450 nm 波长, HH-2 电热恒温水浴锅进行水浴操作。

1.2.3 样品的收集、保存

使用干燥、清洁的容器采集疑似中毒的样品, 短期保存的样本应放置在 4 °C 低温冰箱中, 保存时间一般不超过一周, 实验时要避免反复冻融。长期保存的样本应放置在 -20 °C 或更低温度的冰箱中, 以避免样品变质或产生污染。样本应放置在清洁干燥的区域, 并保持密封状态, 避免外界污染, 确保样品的质量和稳定性。

1.2.4 样品预处理

将标本室温放置 30 min, 准确称取留存的芸豆食物样品 1 g 置于 15 mL 离心管中, 加入 5.0 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4), 手工或匀浆器将标本充分混匀, 在 4 °C 低温高速离心机以 2000~3000 r/min 离心 20 min, 收集上清液^[8], 分装若干份小瓶待测定 -20 °C 下存放, 并尽快完成测定^[9-11]。如果是富含大豆凝集素的样品, 需稀释合适倍数后再检测^[12-15]。

1.2.5 标准曲线的绘制

(1) 标准品的稀释

先吸取 150 μL 试剂盒中 800 mg/L 的大豆凝集素溶液加入 150 μL 标准品稀释液中, 依梯次逐级稀释配制成 0、25、50、100、200、400 μg/mL 的大豆凝集素标准溶液系列; 加到酶标板中。

(2) 加样

准确吸取 50 μL 大豆凝集素标准溶液加进 6 个包被大豆凝集素抗体微孔板里, 待测样品孔同样加入 50 μL(样品 10 μL 与样品稀释液 40 μL 混匀), 标准与样品加样时移液枪尽量悬浮在微孔上方, 小心吹打混匀后, 轻磕 96 孔板, 确保微孔壁上无液体。

(3) 孵育

封板膜密封后, 37 °C 孵育 30 min。

(4)配液

把浓缩洗涤液稀释 30 倍待用。

(5)洗涤

撕掉封板膜后, 弃去微孔中的游离的大豆凝集素或大豆凝集素抗体, 倒扣 96 孔板拍打, 所用的微孔内加入上述洗涤液, 反应 0.5 min 左右后弃去液体, 如此洗涤操作重复 4 次后, 拍干。

(6)加酶

除空白孔, 其他孔均加入 HRP 标计大豆凝集素抗体。

(7)孵育、洗涤

操作过程同 1.2.5(3)和 1.2.5(5)。

(8)显色

在标准系列孔与样品微板孔中分别缓缓注入 50 μL 显色剂 A 与加入 50 μL 显色剂 B, 混匀, 孵育箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右催化显色反应 10 min 以上, 标准系列溶液呈蓝色。

(9)终止

在所有微孔中均加 50 μL 稀硫酸终止液, 显色反应终止, 标准系列颜色转为黄色。

(10)测定

用空白标准品溶液的吸光度调零, 检测波长为 450 nm, 分别记录所有微板孔中的吸光度(OD 值)^[16-17]。注意测定标准系列与样品中大豆凝集素含量应在加终止液后 15 min 内进行。以不同浓度大豆凝集素标准品为横坐标(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)、相对光密度 OD 所测数值作为纵坐标(Y), 构建标准曲线, 进而计算出该曲线的回归方程式以及对应的相关系数, 在 0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的线性范围内, 所得大豆凝集素的线性方程为 $Y=0.0021X+0.0528$, $r=0.9998$ 。流程图见图 2。

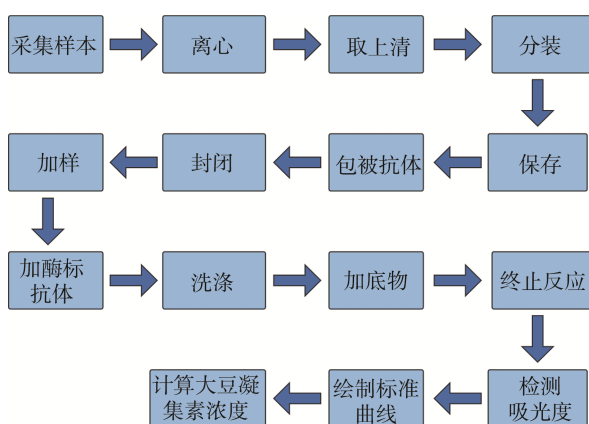


图 2 样品处理检测和分析数据简易流程图

Fig.2 Simple flow chart of sample processing detection and data analysis

1.2.6 样品的测定

样品测定与标准曲线测定同时进行, 在标记好的待

测样品孔中, 操作时首先注入 40 μL 的样品稀释液, 然后再注入 10 μL 的样品提取液, 加样时移液枪头尽量不触碰孔壁, 加好样品液之后轻轻混匀晃动, 注意不要晃出管外, 按照标准曲线绘制步骤测定样品空白、样品的 OD 值, 以样品减去试剂空白的 OD 值后, 由绘制的标准曲线计算样品中大豆凝集素的浓度, 见公式(1)。

$$X = \frac{(\rho_{\text{样}} - \rho_{\text{空}}) \times V \times a \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中: X 为大豆凝集素的浓度, mg/kg ; $\rho_{\text{样}}$ 为样品提取液中大豆凝集素的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$; $\rho_{\text{空}}$ 为空白液中大豆凝集素的质量浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$; V 为样品处理液的体积, mL ; a 为样品的稀释倍数; m 为样品重量, g 。

1.3 数据处理

记录标准品和样本的吸光度(OD 值), 减去空白孔(无样本或试剂的对照)的 OD 值, 消除非特异性信号, 将 OD 值导入 Microsoft Excel 2021, 剔除异常值, 同一样本在同一板上重复检测 ≥ 3 次, 评估操作误差, 通过上述方法, 系统完成从数据采集到结果可视化的全流程分析, 确保实验结果的可靠性与科学性。

2 结果与分析

2.1 测定条件优化

2.1.1 磷酸盐缓冲液 pH 选择

通过实验发现, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液的 pH 与大豆凝集素在人体内部分环境的 pH 相似, 较为稳定, 不会对细胞和分子的生理功能产生影响; 且缓冲能力较强, pH 7.4 的磷酸盐缓冲液在这个 pH 下具有较强的缓冲能力, 可以有效地维持溶液的 pH 稳定。反应体系中大豆凝集素浓度和缓冲溶液 pH 对实验影响程度较大, 是完善 ELISA 检测标准化程序的关键因素^[18-21]。

2.1.2 抗原、抗体的最适工作浓度的确定

将大豆凝集素的标准溶液 0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与酶标孔中的捕获抗体捕捉样品中的游离抗原, 与检测抗体形成夹心复合物, 结合酶标二抗, 通过显色反应判定样品中抗原物质的浓度。酶标仪通常要求在 18~25 $^{\circ}\text{C}$ 的室温下使用^[22-26], 测得标准曲线相关系数 $r=0.9998$ 。

2.1.3 孵育、洗涤时间的选择

大豆凝集素标准溶液与样品溶液各 50 μL 保持环境温度在 20 $^{\circ}\text{C}$ 左右, 孵育时间为 30 min, 孵育温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 左右和显色时间为 10 min、洗涤至少 4 次, 用力甩干, 不能有残余液体, 用酶标仪显色测定效果较好^[27-29]。

2.1.4 洗涤液选择

使用试剂盒配套的浓缩洗涤液 30 倍稀释后使用, 以确保实验结果的准确性和一致性, 如果试剂盒内的洗涤液用完, 建议使用同一批号的洗涤液; 不建议混用不同系列

项目的洗涤液, 不同项目的洗涤液成分可能不同^[30-31], 可能会影响实验结果。

2.2 线性范围、回归方程与检出限

大豆凝集素在 0~400 $\mu\text{g/mL}$ 的线性范围内, 线性良好, 其回归方程为 $Y=0.0021X+0.0528$, 相关系数 $r=0.9998$, 此次生物试剂盒的检出限为 125 mg/kg。

2.3 准确度、精密度实验

分别向超纯水(空白样)不同的样品孔中加入大豆凝集素标准溶液, 配制成 50、100、400 $\mu\text{g/mL}$ 3 个浓度点, 每个浓度均测定 6 次, 进行批间精密度计算, 计算测定结果的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), RSD 在 1.27%~2.24%。见表 1。

表 1 准确度、精密度实验
Table 1 Accuracy and precision recovery rate experiment

编号	质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	测得值平均 质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	平均质量 浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	RSDs/%
1	50	50.3、50.6、48.9、51.9、 48.2、51.2	50.2	1.27
2	100	98.0、100.6、100.9、 102.0、100.8、102.1	100.7	1.35
3	400	399.5、398.3、400.6、 403.7、402.8、400.9	400.6	2.24

2.4 加标回收率实验

为验证 ELISA 实验方法检测大豆凝集素的准确性, 需要对大豆凝集素做加标回收实验。根据大豆凝集素标准曲线的 OD 值确定 3 个加标浓度。分别向超纯水(空白样)不同的样品孔中加入大豆凝集素标准溶液, 配制成 50、100、400 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度点, 每个浓度均测定 6 次, 用测定平均值减去空白值后计算大豆凝集素的加标回收率。做一组空白, 加标回收率在 99.17%~101.20%之间, 见表 2。

表 2 加标回收率实验
Table 1 Recovery rate experiment with added standards

编号	底液质量 浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	加标质量 浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	测得值平均 质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	回收率 /%
1	0.0	50	50.12	100.24
2	0.0	100	101.20	101.20
3	0.0	400	396.70	99.17

2.5 样品测定

由某食品店集中供餐引起的一起芸豆中毒事件, 经调查芸豆初加工洗净后入沸水焯水约 30 s 捞出, 入油锅加蒜泥调味翻炒 1 min 左右出锅。调查员现场查看留样食品,

蒜泥芸豆颜色青绿, 指掐感觉较为生硬。部分患者自述食用蒜泥芸豆感觉比较生未煮熟。从采集的留样食品蒜泥芸豆检出大豆凝集素, 对四季豆样品进行多次测定, 测得均值为 225 mg/kg。食品安全管理机构, 包括联合国粮食及农业组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会等, 并未就植物血球凝集素进行评估, 未订定用作风险评估的健康参考值。

3 讨论与结论

使用电热恒温水槽时要加入适量的水, 通常是加至离槽口约 5 cm 的位置, 避免水位过低导致加热元件露出水面造成损坏; 校准温度计以确保实验时的温度读数准确, 使用过程中的注意事项, 根据实验需求设置 37 $^{\circ}\text{C}$, 避免过高或过低的温度造成实验误差或损坏实验物品; 缓慢升温, 不要将温度设定过高后突然打开加热器, 以防水温急剧上升导致水溢出或设备过热; 在加热过程中注意及时补水, 避免因水位过低而导致设备过热, 操作时需小心。

双抗体夹心 ELISA 法在对豆类食品中大豆凝集素的实验中, 准确性和灵敏度都较稳定。ELISA 测定大豆凝集素的报道不多, 本方法利用双抗体夹心 ELISA 法在准确度、精密度、回收率实验中 RSD 在 1.27%~2.24%, 加标回收率在 99.17%~101.20%之间。与前期研究结果一致, 庞杏豪^[9]作出大豆凝集素免疫学快速检测方法的研究。就成分相对单一的豆类食品而言, 夹心 ELISA 法在检测其中大豆凝集素时更有优势, 能更为精准高效地完成工作; 而那些经过深度加工、在较为严苛加工条件下制成的食品, 由于成分复杂、结构改变等因素影响, 竞争 ELISA 法就成了测定其内部大豆凝集素含量的优选策略。在此基础上, 本研究初步搭建起了双抗体夹心 ELISA 法检测大豆凝集素的方法, 通过实际中毒样品的检测, 结果表明, 双抗体夹心 ELISA 法适用于中毒样品准确的检测。在进行加标回收实验中, 有复杂基质效应的存在, 中毒食物样品越是复杂, 回收率就越低, 可能是因为食物复杂基质组分之间的相互作用来影响大豆凝集素的检测。

本研究中 ELISA 法检测大豆凝集素的方法, 分析时间短, 重现性较好, 操作简便, 检测费用成本低等优势。由于其携带方便、检测速度快, 很适合基层疾控中心对疑似大豆凝集素中毒事件进行定性、定量分析, ELISA 法检测大豆凝集素必备条件允许可应用于现场检测中毒样品。缺点是有效期只有半年。此次在检测大豆凝集素的同时, 实验人员要掌握酶标仪使用的基础操作, 保持孵育箱的温度平衡, 不同样品处理的提取体积。在预防大豆凝集素中毒的同时, 餐饮服务单位要严格执行食品安全管理制度, 保持操作环境卫生整洁, 食物制作应烧熟煮透, 四季豆应炒或焖至颜色全变, 无豆腥味再食用。加强对食品经营者食

品卫生及食品安全知识培训, 严格执行食品安全法有关规定, 及早采取预防措施, 严格执行留样制度。通过公众号向社会进行芸豆中毒的知识宣传, 增强群众自我保护意识, 确保自身的食用安全。本研究运用双抗体夹心 ELISA 法测定大豆凝集素实验适合基层疾病预防控制中心定性定量使用。

参考文献

- [1] 姜红金. 一起芸豆引起食源性疾病事件的流行病学调查分析[J]. 中国农村卫生, 2024, 16(8): 66-67.
JIANG HJ. Epidemiological investigation and analysis of a foodborne disease incident caused by kidney beans [J]. *China Rural Health*, 2024, 16(8): 66-67.
- [2] 刘佳伟, 赵进鹏, 鄂天姣, 等. 大豆凝集素诱导动物肠道损伤的抗营养机制的研究进展[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(6): 1295-1301.
LIU JW, ZHAO JP, E TJ, *et al* Research progress on the anti nutritional mechanism of soybean agglutinin induced intestinal injury in animals [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2022, 42(6): 1295-1301.
- [3] 梅胜尧, 张逸民, 高庆发. 大豆凝集素对兔小肠组织的氧化应激与炎症因子的影响[J]. 中国饲料, 2024(1): 66-70.
MEI SY, ZHANG YM, GAO QF. The effect of soybean agglutinin on oxidative stress and inflammatory factors in rabbit small intestine tissue [J]. *Chinese Feed*, 2024(1): 66-70.
- [4] 罗明迪, 王若秋, 张文驹. 上海市大豆及豆腐转基因成分检测[J]. 大豆科技, 2021(2): 14-20.
LUO MD, WANG RQ, ZHANG WJ. Detection of genetically modified components in soybeans and tofu in Shanghai [J]. *Soybean Science and Technology*, 2021(2): 14-20.
- [5] 吴金辉, 吕喆, 张重阳, 等. 水母生物毒素提取纯化及其生物活性研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2021, 35(4): 26-33.
WU JH, LV Z, ZHANG CY, *et al*. Research progress on extraction, purification and biological activity of jellyfish biotoxin [J] *Journal of Hebei Normal University of Science and Technology*, 2021, 35(4): 26-33.
- [6] 彭博文, 岳静, 王轶楠, 等. 玉米新月弯孢菌次级代谢产物的分离纯化及除草活性[J]. 农药, 2024, 63(8): 572-576.
PENG BW, YUE J, WANG YN, *et al* Isolation, purification, and herbicidal activity of secondary metabolites from corn crescent fungus [J]. *Pesticide*, 2024, 63(8): 572-576.
- [7] 李基业, 张博, 谷子丰, 等. 近红外光谱技术快速预测大豆中主要抗营养因子含量[J]. 中国畜牧杂志, 2024, 60(12): 344-348.
LI JY, ZHANG B, GU ZF, *et al*. Rapid prediction of major anti nutritional factors in soybeans using near-infrared spectroscopy technology [J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry*, 2024, 60(12): 344-348.
- [8] 陈凯楠, 李金斗, 丁佳欣, 等. BCSP31 蛋白双抗夹心 ELISA 定量方法的建立及应用[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(4): 699-705.
CHEN KN, LI JD, DING JX, *et al* Establishment and application of BCSP31 protein double antibody sandwich ELISA quantitative method [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2024, 44(4): 699-705.
- [9] 庞杏豪. 大豆凝集素免疫学快速检测方法的研究[D]. 郑州: 河南科技大学, 2022.
PANG XH. Research on rapid immunological detection methods for soybean agglutinin [J]. Zhengzhou: Master's thesis, Henan University of Science and Technology, 2022.
- [10] 靳颖. 超高效液相色谱法检测大豆异黄酮含量[J]. 现代食品, 2024(3): 186-188, 193.
JIN Y. Detection of soy isoflavone content by ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Modern Food*, 2024(3): 186-188, 193.
- [11] 孙玉凤, 黄亚涛, 刘佳萌, 等. 超高效液相色谱法检测 58 种大豆中的 4 种嘌呤化合物[J]. 中国食品学报, 2023, 23(6): 304-313.
SUN YF, HUANG YT, LIU JM, *et al*. Detection of 4 purine compounds in 58 types of soybeans by ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2023, 23(6): 304-313.
- [12] 朱梦男, 金日生, 张华, 等. 反相高效液相色谱法测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱含量[J]. 粮食与油脂, 2023, 36(11): 159-162.
ZHU MN, JIN RS, ZHANG H, *et al*. Determination of phosphatidylcholine content in soybean phospholipids by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Cereals & Oils*, 2023, 36(11): 159-162.
- [13] 吴俊发, 谭健辉, 马鑫, 等. 超高效液相色谱法同时测定保健品中 4 种大豆异黄酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(6): 2264-2269.
WU JF, TAN JH, MA X, *et al*. Simultaneous determination of four soy isoflavones in health products by ultra-high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(6): 2264-2269.
- [14] 路蕴, 曹春梅, 王安宁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定植物源性食品中丁氟螨酯及其代谢物的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(1): 25-31.
LU Y, CAO CM, WANG ANN, *et al*. Determination of residual levels of bufotaxime and its metabolites in plant-based foods by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Physical and Chemical Testing Chemical Volume*, 2022, 58(1): 25-31.
- [15] 侯建波, 谢文, 史颖珠, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定葛根中 11 种黄酮苷元的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2021, 57(10): 865-872.
HOU JB, XIE W, SHI YZ, *et al* Simultaneous determination of 11 flavonoid glycosides in pueraria root by solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Physical and Chemical Testing Chemistry Volume*, 2021, 57(10): 865-872.
- [16] 朱礼艳, 李思越, 黄建联, 等. 大豆过敏原夹心 ELISA 和竞争 ELISA 方法的建立及其在加工食品中应用研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(24): 180-188.
ZHU LY, LI SY, HUANG JL, *et al*. Establishment of sandwich ELISA and competitive ELISA methods for soy allergens and their application in processed foods [J]. *Food Industry Science and Technology*, 2022, 43(24): 180-188.
- [17] 龙静, 纪国存, 王欣惠, 等. H 因子结合蛋白抗原含量双抗夹心 ELISA 检测方法的优化与应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2024, 52(3): 34-44.
LONG J, JI GC, WANG XH, *et al*. Optimization and application of double antibody sandwich ELISA detection method for H-factor binding protein antigen content [J]. *Advances in Microbiology and Immunology*, 2024, 52(3): 34-44.
- [18] 任可芸, 于春蕾, 杨青青. 酶联免疫吸附法检测花生中黄曲霉毒素 B₁ 的影响因素分析[J]. 山东理工大学学报(自然科学版), 2023(3): 73-78.
REN KY, YU CL, YANG QQ. Analysis of influencing factors on enzyme-linked immunosorbent assay for detecting aflatoxin B₁ in peanuts [J].

- Journal of Shandong University of Technology (Natural Science Edition), 2023(3): 73–78.
- [19] 张蕴哲, 张先舟, 袁耀武, 等. 免疫亲和层析技术协同酶联免疫吸附法检测赭曲霉毒素 A[J]. 食品科学, 2024(10): 257–264.
ZHANG YZ, ZHANG XZ, YUAN YW, *et al.* Immunoaffinity chromatography combined with enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ochratoxin A [J]. Food Science, 2024(10): 257–264.
- [20] 刘军, 曾施宇, 朱浩宇, 等. 集成化酶联免疫微流控平台检测红酒中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(17): 222–231.
LIU J, ZENG SY, ZHU HY, *et al.* Integrated enzyme-linked immunosorbent assay microfluidic platform for detecting ochratoxin A in red wine [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(17): 222–231.
- [21] 张宁, 赵志琴, 范志华, 等. 酶联免疫吸附法快速检测黄曲霉毒素[J]. 食品研究与开发, 2021(3): 146–150.
ZHANG N, ZHAO ZQ, FAN ZH, *et al.* Rapid detection of aflatoxin by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Research and Development, 2021(3): 146–150.
- [22] 朱芳茜, 何扩, 张秀媛, 等. 水产品中志贺氏菌双抗夹心 ELISA 检测方法建立与应用[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(4): 156–160.
ZHU FQ, HE K, ZHANG XY, *et al.* Establishment and application of sandwich ELISA detection method for Shigella in aquatic products [J]. Food Research and Development, 2021, 42(4): 156–160.
- [23] 谢雨薇, 郁红礼, 吴皓, 等. 半夏凝集素蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 的建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6076–6081.
XIE YW, YU HL, WU H, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against Pinellia ternata agglutinin protein and establishment of double antibody sandwich ELISA [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 47(22): 6076–6081.
- [24] 周立娟, 井申荣, 苑荣亮, 等. 夹心 ELISA 检测新冠病毒及其抗原方法的建立和验证[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2022, 44(4): 870–876.
ZHOU LJ, JING SR, YUAN RL, *et al.* Establishment and validation of sandwich ELISA for detection of COVID-19 and its antigen [J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 2022, 44(4): 870–876.
- [25] 张飞雁, 秦涛, 谢红玲, 等. 猪肺炎支原体 p46 蛋白定量检测双抗夹心 ELISA 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2024(11): 64–69.
ZHANG FY, QIN T, XIE HL, *et al.* Establishment of a dual antibody sandwich ELISA method for quantitative detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* p46 protein [J]. Advances in Veterinary Medicine, 2024(11): 64–69.
- [26] 庄素素, 李巍, 沈万鹏, 等. 一种新型冠状病毒双抗夹心 ELISA 检测方法的建立及评价[J]. 药物生物技术, 2023(3): 221–228.
ZHUANG SS, LI W, SHEN WP, *et al.* Establishment and evaluation of a new double antibody sandwich ELISA method for detection of novel coronavirus [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2023(3): 221–228.
- [27] 张世伟, 吴会玲, 周迎春, 等. 基于衍生化 3-氨基-2-恶唑烷酮的夹心酶联免疫分析[J]. 食品科学, 2024(6): 271–276.
ZHANG SW, WU HL, ZHOU YC, *et al.* Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay based on derivatized 3-amino-2-oxazolidinone [J]. Food Science, 2024(6): 271–276.
- [28] 许立琼, 史雨红, 陈炯. 香鱼 LECT2 双抗体夹心 ELISA 法的建立及初步应用[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(7): 1703–1714.
XU LQ, SHI YH, CHEN J. Establishment and preliminary application of a double antibody sandwich elisa method for xiang yu LECT2 [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(7): 1703–1714.
- [29] 王婉, 唐悦, 赵忆宁, 等. 呼吸道合胞病毒滴度双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 国际免疫学杂志, 2024(1): 33–38.
WANG W, TANG Y, ZHAO YN, *et al.* Establishment of double antibody sandwich ELISA for detection of respiratory syncytial virus titer [J]. International Journal of Immunology, 2024(1): 33–38.
- [30] 李其炫, 岳慧贤, 蒋依倩, 等. 双抗体夹心 ELISA 检测 ASFV 抗原方法的建立与评价[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(8): 1579–1584, 1592.
LI QX, YUE HX, JIANG YQ, *et al.* Establishment and evaluation of double antibody sandwich ELISA for ASFV antigen detection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2024, 44(8): 1579–1584, 1592.
- [31] 朱文嘉, 陈江平, 秦智慧, 等. 双抗体夹心酶联免疫吸附法检测鱼糜制品中鸡蛋卵白蛋白[J]. 食品安全检测质量学报, 2023, 14(6): 190–197.
ZHU WJ, CHEN JP, QIN ZH, *et al.* Double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting egg white protein in fish mince products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(6): 190–197.

(责任编辑: 蔡世佳 安香玉)