

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250312006

引用格式: 范佳怡, 韦琳, 朱明雪, 等. 基于金属有机框架负载铂纳米粒子标记免疫方法检测脂多糖[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(12): 106–115.

FAN JY, WEI L, ZHU MX, *et al.* Detection of lipopolysaccharide using metal-organic framework-supported platinum nanoparticle-labeled immunoassay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(12): 106–115. (in Chinese with English abstract).

基于金属有机框架负载铂纳米粒子标记免疫方法 检测脂多糖

范佳怡, 韦琳, 朱明雪, 曹立民, 王凯强, 王秀丹, 隋建新*

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要: **目的** 基于金属有机框架负载铂纳米粒子标记免疫方法检测脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。**方法** 通过外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)免疫小鼠获得 LPS 的多克隆抗体, 并制备由金属有机框架负载铂纳米粒子(platinum nanoparticles, Pt NPs)的复合纳米酶作为抗体的信号标记物结合酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 进一步建立针对 LPS 的新型免疫传感器。**结果** 免疫获得效价为 1:256000 的 LPS 抗体。在构建的基于复合纳米酶的比色免疫分析方法中, 检测 LPS 的结果显示: 检出限为 5 ng/mL, 较使用天然酶标记抗体的 ELISA 方法灵敏度提高了 4 倍, 线性检测范围为 20~2000 ng/mL, 且具有良好的稳定性和特异性, 在苹果汁和啤酒中回收率为 90.38%~105.71%。**结论** 本研究研制了特异性强、效价高的 LPS 抗体, 建立的 Pt@MIL101-NH₂-ELISA 方法具有良好的灵敏度和稳定性, 为 LPS 的免疫检测提供了新思路。

关键词: 脂多糖; 外膜囊泡; 金属有机框架; 纳米酶; 酶联免疫吸附法

Detection of lipopolysaccharide using metal-organic framework-supported platinum nanoparticle-labeled immunoassay

FAN Jia-Yi, WEI Lin, ZHU Ming-Xue, CAO Li-Min, WANG Kai-Qiang,
WANG Xiu-Dan, SUI Jian-Xin*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

ABSTRACT: Objective To detection of lipopolysaccharide (LPS) by platinum nanoparticle labeling immunoassay based on metal-organic framework. **Methods** LPS polyclonal antibodies were obtained through immunization of mice with outer membrane vesicles (OMVs). A composite nanozyme consisting of platinum nanoparticles (Pt NPs) loaded on metal-organic framework (MIL101-NH₂) was prepared as a signal label. This nanozyme was integrated with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to establish a novel immunosensing platform for LPS detection.

收稿日期: 2025-03-12

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2023CXGC010709)

第一作者: 范佳怡(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品安全与质量控制。E-mail: fanfanjiayi@163.com

*通信作者: 隋建新(1981—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为水产品安全与质量控制。E-mail: suijianxin@ouc.edu.cn

Results The prepared LPS antibodies demonstrated a titer of 1:256000. The constructed nanozyme-based colorimetric immunoassay showed the limit of detection was 5 ng/mL (4-fold improvement in sensitivity compared with conventional enzyme-labeled ELISA), linear detection range of 20–2000 ng/mL, and satisfactory stability and specificity. Recoveries in apple juice and beer samples ranged from 90.38% to 105.71%. **Conclusion** This study develop LPS antibodies exhibited high specificity and strong titer. The establish Pt@MIL101-NH₂-ELISA method demonstrated enhanced sensitivity and reliability, providing a new approach for immunological detection of LPS.

KEY WORDS: lipopolysaccharide; outer membrane vesicles; metal-organic framework; nanozyme; enzyme-linked immunosorbent assay

0 引言

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)又称内毒素,是革兰氏阴性菌的细胞壁外壁上特有的结构^[1],由脂质 A、核心多糖以及 O-抗原组成。其中, O-抗原由多个重复的寡糖单位构成,其结构多样性决定了细菌的血清分型特征,这对于菌株分类及致病机制分析具有重要意义^[2]。LPS 的脂质 A 组分是引发免疫反应的核心要素^[3],具有显著的危害。LPS 能够引发发热、白细胞减少、低血压等一系列症状,甚至可能诱发败血症休克^[4-5],会在细菌细胞死亡、裂解、生长和增殖过程中伴随外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)被释放到环境中。LPS 结构稳定,难以去除,极易在药物、水源、食品、医疗器械及生物制品生产环节中形成内毒素残留污染^[6]。因此,快速且准确地测定 LPS 含量对保障人类健康具有重要意义。

LPS 的常用检测方法主要有传统兔热原试验(rabbit pyrogen test, RPT)法、鲎试剂检测(limulus ameocyte lysate test, LAL)法等^[7]。RPT 作为经典方法具有检测多种热原的优势。然而,该方法无法实现 LPS 定量检测,且实验结果易受实验动物个体差异影响,导致重复性欠佳^[8-9]。LAL 法基于鲎血细胞裂解物与 LPS 的特异性凝血反应,是目前检测内毒素的金标准^[10],该方法具有快速、简便、灵敏度高和重复性好等特点^[11]。但其检测结果易受样本基质颜色影响,且过度依赖鲎血生物资源,对保护动物鲎的种群生存构成威胁^[9,11]。

酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)因兼具抗体高特异性与酶的放大效应^[12],能排除样品颜色干扰,具备特异性强、准确性高等优势,故而被用于内毒素检测。然而,天然酶稳定性欠佳且负载能力有限等问题^[13-14],导致其检测灵敏度相较于 LAL 法存在较大差距。此外,LPS 属于胸腺非依赖(thymus-independent, TI)抗原,仅能引发体液免疫,无法诱导抗体亲和成熟及免疫记忆^[15-16]。因此,依照常规免疫手段,难以获取高亲和力的 LPS 抗体(antibody, Ab)。而直接采用灭活菌体进行免疫时,灭活过程可能改变病毒抗原结构,致使部分抗原表位被破坏或修饰^[17-18],显著降低其免疫原性。鉴于上述原因,

ELISA 方法在 LPS 实际检测中的应用受到一定限制。

OMVs 是革兰氏阴性菌外膜在一定的机制下发生出芽并在细菌表面形成的一种囊泡状的结构,这种结构包括了外膜以及周质成分^[19]。近年许多研究发现 OMVs 具有良好的免疫原性^[20-21]。OMVs 呈球形结构,拥有较高的比表面积,这使得其中 LPS 呈现显著富集状态^[22-23],OMVs 表面 LPS 的密度可达游离 LPS 单体的 10~100 倍。OMVs 不仅能诱导机体产生适应性免疫记忆,还可作为自身佐剂增强免疫应答^[24-25]。与细胞外的 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4)识别 LPS 的方式不同,OMVs 能够通过内吞作用进入细胞,进而形成吞噬泡。即便处于吞噬泡中,OMVs 的 LPS 依然可以与 TLR4 受体相互作用,调节机体免疫^[26]。因此 OMVs 中少量的 LPS 即可发挥有效的免疫调节功能。

金属有机框架(metal-organic framework, MOFs)是一类由金属离子或离子簇与有机配体连接而成的孔配位聚合物^[27-29],迄今为止,已经开发出大量具有类酶催化活性的 MOFs^[30-32]。MOFs 纳米酶有着性质稳定、成本低,且制备过程简单、容易大规模制备的优点^[33]。同时金、铂纳米粒子(platinum nanoparticles, Pt NPs)等贵金属纳米颗粒具有优异的过氧化物模拟酶活性但其易团聚的特性常导致颗粒尺寸增大、活性位点减少,进而降低催化效率。由于 MOFs 具有较好的生物相容性、高比表面积和丰富的孔隙结构,为纳米颗粒提供了大量的附着位点,不仅可以有效抑制其团聚现象,还能与纳米颗粒产生协同作用^[34-35],提升整体催化性能^[36],在多种催化反应中呈现出优异效果。

本研究采用大肠杆菌 OMVs 免疫小鼠获得 LPS 多克隆抗体,并进一步设计合成 Pt@MIL101-NH₂ 复合纳米酶。为了能在 Pt@MIL101-NH₂ 表面结合更多抗体,在 Pt@MIL101-NH₂ 表面包覆稳定性好、生物相容性良好的聚多巴胺(polydopamine, PDA)^[37],通过其表面大量的醌类官能团与抗体发生迈克尔加成反应,将二抗(secondary antibodies, Ab₂)共价偶联到聚多巴胺表面^[38-39],合成信号标记物 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂,结合多粘菌素 B (polymyxin B, PMB)对 LPS 的强烈的特异性吸附作用^[40],构建 PMB 与抗体联用的夹心 ELISA。构建基于

Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂的ELISA方法检测LPS,为食品中LPS的现场检测技术的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌外膜囊泡 ΔNLPI@LptDE (南方科技大学李颜颜课题组馈赠); BALB/c 小鼠(雌性, 6~8 周龄)购自济南朋悦实验动物繁育有限公司, 饲养在中国海洋大学食品科学与工程学院动物中心, 实验过程严格按照动物福利要求进行操作。苹果汁、啤酒购自青岛当地超市。

2-氨基对苯二甲酸(2-aminoterephthalic acid, NH₂-BDC)、盐酸多巴胺(dopamine hydrochloride, DA-HCl)(分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、乙醇、甲醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl) aminoethane, Tris, 分析纯]、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS, 分析纯)、碳酸盐缓冲液(carbonate buffer solution, CBS, 分析纯)、3,3',5',5'-N,N'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB, 纯度>99%)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶试剂盒、吐温 20(纯度>98%)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度≥98%)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA, 纯度≥80%)、G8061 明胶、SL038 山羊血清、SE131 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记羊抗鼠 IgG(北京索莱宝科技有限公司); 脱脂奶粉(纯度>90%, 德国 Einhausen Biofroxx 有限公司)、超滤离心管(截留分子量 10 kD)(美国 Millipore 公司); F5881 弗氏完全佐剂、F5506 弗氏不完全佐剂、L2880 大肠杆菌脂多糖 O55:B5、L2755 大肠杆菌脂多糖 O128:B12、L3129 大肠杆菌脂多糖 O127:B8、L2630 大肠杆菌脂多糖 O111:B4、L3755 大肠杆菌脂多糖 O26:B6(德国 sigma 公司); 三氯化铁六水合物(FeCl₃·6H₂O)、氯铂酸(H₂PtCl₆·6H₂O)(分析纯)、L755655 肠沙门氏菌脂多糖、L611586 绿脓假单胞菌脂多糖、P105490 PMB[阿拉丁试剂(上海)有限公司]。

1.2 仪器与设备

BCE224-ICCN 分析天平[精度为 0.0001 g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘鑫仪器仪表有限公司); KQ-400-DM 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Wellwash 洗板机、K-AlphaX 射线光电子能谱仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); DZG-6020 真空干燥箱(上海培因实验仪器有限公司); ChemiDocXRS+凝胶成像系统(上海伯乐生命医学产品有限公司); CMax Plus 微孔板酶标仪(上海美谷分子仪器); 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); Smartlab9kwX 射

线粉末衍射仪(日本理学 Rigaku 公司); Jem-2100F 透射电子显微镜(日本电子株式会社); SU8100 扫描电子显微镜(日本日立高科株式会社)。

1.3 实验方法

1.3.1 抗体的制备

以大肠杆菌 OMVs 为抗原(质量浓度为 0.5 mg/mL), 采用皮下多点注射方式免疫小鼠, 每次免疫剂量为 200 μL/只, 共免 6 次。首次免疫用等量弗氏完全佐剂乳化免疫原, 间隔 2 周, 用等量弗氏不完全佐剂乳化免疫原同样方式加强免疫, 每隔 2 周免疫 1 次, 每次免疫后隔 1 周尾尖取血测定效价。加强免疫 4 次后用生理盐水将抗原稀释成 1 mg/mL 冲击免疫 1 次, 3 d 后眼球取血。

1.3.2 抗血清效价测定及纯化

对免疫后的血清分别进行倍比稀释, 然后用 30 μg/mL 的 LPS 包被, 采用间接 ELISA 方法检测抗 LPS 多克隆抗体效价, 测定 450 nm 处吸光值。间接 ELISA 效价检测的结果判定以抗血清的阳性孔吸光值(P)/不加抗血清的阴性孔吸光值(N)之比≥2.1 (P/N≥2.1), 小鼠的抗血清最大稀释倍数定义为抗血清的效价^[41]。选取效价高的抗血清进一步用蛋白 A 重力柱进行纯化, 用蛋白浓度测定(bicinchoninic acid, BCA)法测定纯化后抗体的质量浓度, 并用 SDS-PAGE 鉴定纯化效果。

1.3.3 MIL101-NH₂、Pt NPs 和 Pt@MIL101-NH₂ 的制备

MIL101-NH₂ 的合成: 参考文献[42-43]的方法, 稍作修改。将 0.374 g FeCl₃·6H₂O 和 0.313 g NH₂-BDC 加到 30 mL DMF 溶液中, 超声处理 1 h 后剧烈搅拌 1 h 使之充分溶解。接着将上述溶液置于聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中, 在 120 °C 下反应 12 h, 自然冷却后离心(9000 r/min, 15 min)收集沉淀物并分别用 DMF 和无水乙醇交替离心洗涤 3 次以去除多余的反应试剂, 最后将沉淀产物置于 60 °C 真空干燥过夜, 获得棕褐色粉末样品。

Pt NPs 的合成参考文献[44]。Pt@MIL101-NH₂ 的合成: 称取 100 mg MIL101-NH₂ 超声分散在 50 mL DMF 中, 然后加入 12 mL 上述处理好的 Pt NPs 溶液室温搅拌 16 h。随后, 离心(9000 r/min, 15 min)收集后乙醇洗 3 次。最后将获得的 Pt@MIL101-NH₂ 在 60 °C 下真空干燥过夜, 收集备用。

1.3.4 PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的制备及 PDA@Pt@MIL101-NH₂ 标记羊抗鼠 IgG

通过多巴胺在 Pt@MIL101-NH₂ 表面上的氧化自聚合合成 PDA@Pt@MIL101-NH₂^[45-46]: 将 90 mg Pt@MIL101-NH₂ 超声分散于 90 mL 的超纯水中, 接着将 20 mg DA-HCl 溶解于 90 mL 的 Tris-HCl (pH=8.5)中。然后, 将 DA-HCl 溶液倒入 Pt@MIL101-NH₂ 溶液中, 室温搅拌 12 h 后, 在 Pt@MIL101-NH₂ 表面形成稳定的 PDA, 离心收集产物 PDA@Pt@MIL101-NH₂, 乙醇和超纯水交替洗 3 次,

在 60 °C 下真空干燥过夜后, 研磨成粉末置于干燥罐中保存备用。

Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的制备过程如图 1(a)所示。具体步骤为: 将 1 mg 的 PDA@Pt@MIL101-NH₂ 超声分散于 PBS, 加入 40 μL 羊抗鼠 IgG 二抗 (6 mg/mL), 室温 (10000 r/min, 5 min) 下搅拌 2 h, 离心弃上清, PBST 溶液 (含 0.05% 吐温 20 的 PBS 溶液) 洗 1 次, 重新分散于 1 mL 含 5% BSA 的 PBS 溶液中, 室温下搅拌 1 h, 以达到封闭探针效果。离心弃上清, PBST 溶液洗 2 次, 重新分散于 1 mL 含 0.5% BSA 的 PBS 溶液中, 最后将制备的 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 置于 4 °C 冰箱中保存备用。

1.3.5 基于 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的夹心 ELISA 方法的建立

将 PMB 包被酶标板, LPS 多克隆抗体作为检测抗体, 建立夹心 ELISA 检测方法, 采用棋盘法确定包被浓度、检测抗体的工作浓度和最佳封闭剂。按照以下步骤进行检测 (图 1b): 首先将 PMB 用 CBS (0.05 mol/L, pH=9.60) 稀释至适宜浓度加入到 96 孔板中, 每孔中加入 100 μL, 置于 4 °C 冰箱孵育 12 h。甩掉孔内液体后用 300 μL/孔的 PBST (含 0.05% 吐温 20 的 PBS) 洗 3 次, 拍干待用。往孔中加入 300 μL 的封闭剂后, 置于 37 °C 烘箱孵育 2 h, PBST 洗涤 3 次, 然后加入特定浓度的 LPS, 于 37 °C 烘箱中孵育 1.5 h, PBST 洗涤 3 次后拍干, 再用 PBST 将纯化后的抗体稀释至适宜倍数, 每孔 100 μL, 置于 37 °C 烘箱中孵育 1.5 h, PBST 洗涤 3 次。接着将制备的 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 稀释至 0.1 mg/mL, 每孔加入 100 μL, 于 37 °C 烘箱中孵育 1 h,

PBST 洗涤 5 次后拍干。最后每孔加入 TMB 显色液 100 μL, 并置于 37 °C 烘箱中避光孵育 15 min。显色结果后每孔加入 50 μL 硫酸终止液终止反应。将 96 孔板置于酶标仪 450 nm 处测定吸光值。

1.3.6 基于 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的夹心 ELISA 方法灵敏度及特异性的测定

用 1.3.5 中的优化好的方法检测从大肠杆菌 O55:B5、大肠杆菌糖 O128:B12、大肠杆菌 O127:B8、大肠杆菌 O111:B4、大肠杆菌脂多糖 O26:B6、肠沙门氏菌、绿脓假单胞菌中提取纯化的 LPS, 作为阳性对照的大肠杆菌 O55:B5 LPS 质量浓度设置为 5 μg/mL, 其余所有 LPS 样本均稀释至 10 μg/mL。同时将大肠杆菌 O55:B5 来源的脂多糖系列稀释后进行检测, 确定该检测方法的灵敏度。

1.3.7 加标回收率检测

为验证检测方法在食品基质中的适用性, 选择苹果汁与啤酒两种典型饮品作为代表性样品进行了 LPS 的检测。将苹果汁离心 (10000 r/min, 5 min) 以除去其中的颗粒物, 然后将上清液用 PBS 稀释 10 倍; 将啤酒用 PBS 直接稀释 10 倍进行分析, 加标样品的 LPS 浓度保持在检测的线性范围内。

1.4 数据处理

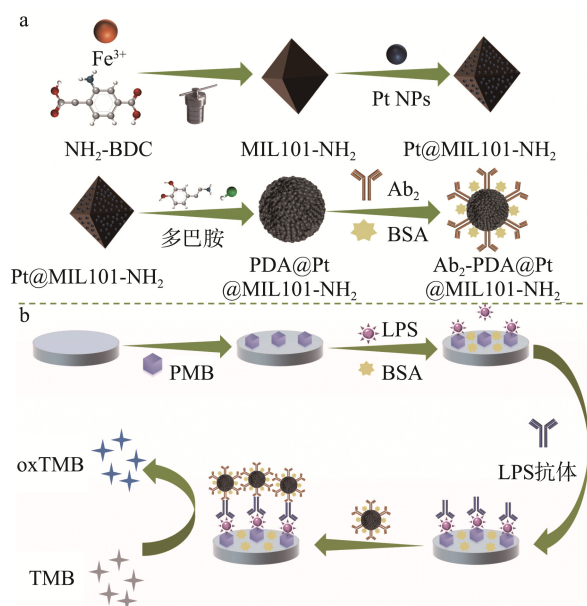
采用 Microsoft Excel 2024、PowerPoint 2024 和 Origin 2018 分析实验数据并绘制图表, 统计学分析采用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行。单因素方差分析后组间显著性差异以不同小写字母标注 ($P < 0.05$)。各实验处理均设置 3 次独立重复实验以确保结果可靠性。

2 结果与分析

2.1 抗血清的效果评价

间接 ELISA 测定抗血清的结果 (图 2) 表明随着免疫次数的增加, 针对 LPS 的特异性抗体数量也逐渐增加, 经过 6 次免疫后, 小鼠抗血清的效价可以达到 1:256000, 对照设立的阴性组 (仅注射免疫佐剂) 效价在整个免疫过程中基本为零且保持不变。该结果证实诱导产生的抗体与细菌脂多糖抗原表位具有特异性结合能力, 排除非特异性免疫应答的干扰。该免疫策略所制备的脂多糖抗血清效价显著高于文献报道的直接使用大肠杆菌脂多糖免疫制备的抗血清 (1:12800~1:16000)^[47-48]。

本研究选取了对 LPS 有较好识别效果的小鼠抗血清进行蛋白 A 柱纯化。从 SDS-PAGE 结果 (图 3) 可以看到泳道 4 中有两条明显的条带, 分子量分别约为 50 kDa 和 25 kDa, 其与 IgG 抗体的重链、轻链分子量大小相吻合。而在泳道 2、3 中看不到与 IgG 抗体的重链、轻链大小相符的条带, 且其他杂质蛋白条带较为明显, 此结果表明蛋白 A 柱层析可特异性捕获血清中 IgG 组分, 同时有效去除杂蛋白。



注: (a) Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 免疫探针的制备; (b) 基于 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的 ELISA 检测 LPS 示意图。

图 1 基于 MOFs 的 ELISA 检测 LPS 原理示意图

Fig.1 Schematic diagram of MOFs-based enzyme-linked immunoassay for LPS detection

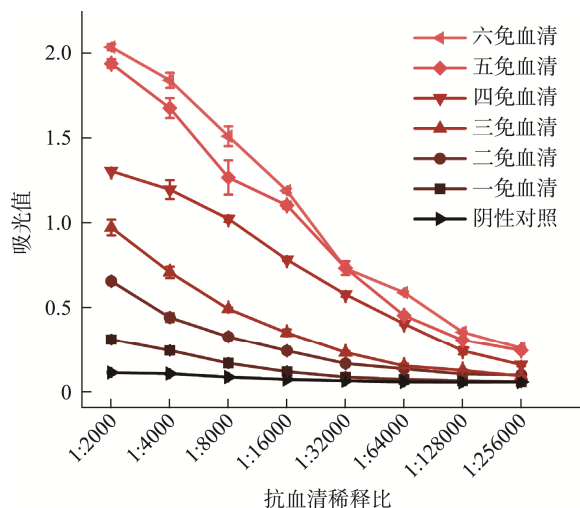
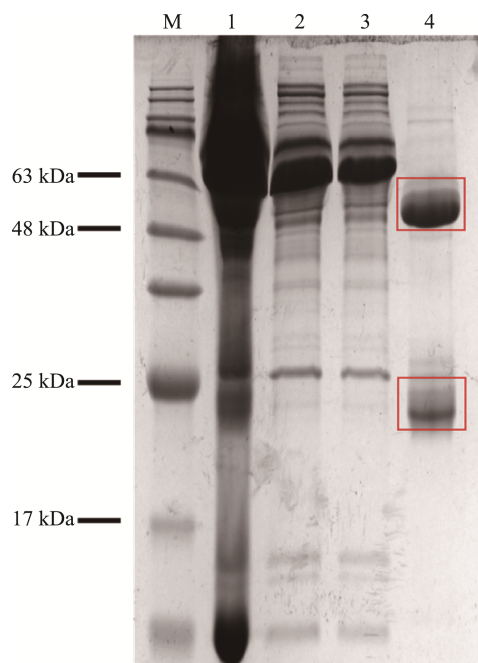


图 2 小鼠抗血清的效价测定

Fig.2 Determination of the titration of mouse antiserum



注: 泳道 M 为标准蛋白, 泳道 1 为抗血清原液, 泳道 2 为流出液, 泳道 3 为洗杂液, 泳道 4 为洗脱液。

图 3 抗血清纯化 SDS-PAGE 图

Fig.3 SDS-PAGE image of purified antiserum

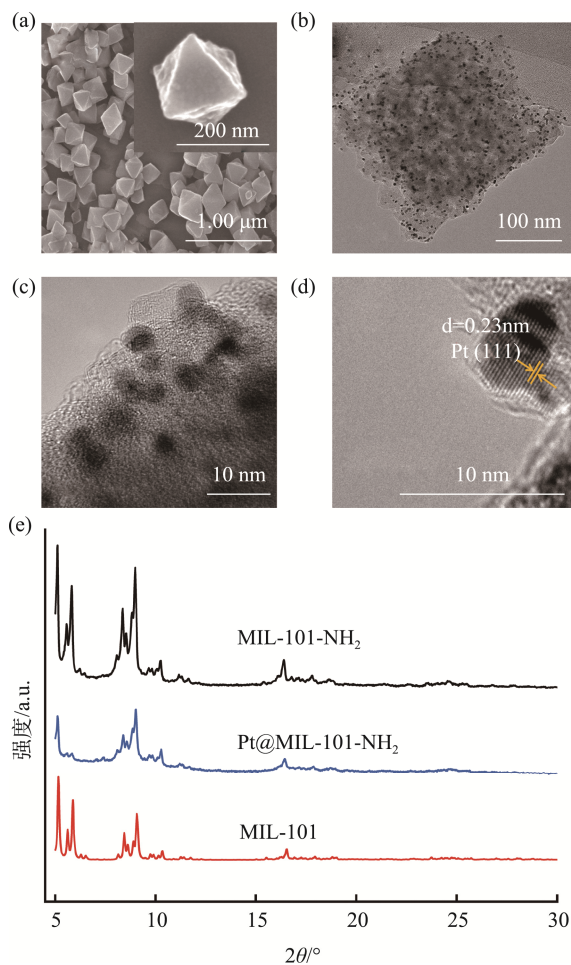
2.2 Pt@MIL101-NH₂ 复合纳米酶的表征及其类酶活性鉴定

由 MIL101-NH₂ 的扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)[图 4(a)]结果可知, 利用溶剂热法合成的 MIL101-NH₂ 具有规则的八面体形态, 分散性良好且粒径大小均匀, 平均粒径在 145 nm 左右适用于 ELISA 检测。通过简单的搅拌作用成功制备 Pt@MIL101-NH₂ 复合纳米酶, 其透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)图像(图 4b)和高分辨率透射电子显微镜(high

resolution transmission microscopy, HRTEM)图像[图 4(c)]显示 Pt NPs 均匀且密集地分布在 MIL101-NH₂ 表面, MIL101-NH₂ 形貌结构和尺寸没有发生明显变化且未观察到颗粒聚集或过度生长的现象。从图 4(d)可以看到固定在 MIL101-NH₂ 上的 Pt NPs 的晶格间距为 0.23 nm, 与 Pt 的 (111)面一致, 证实 Pt 以结晶态形式存在。

此外, 进行了 MIL101-NH₂ 和 Pt@MIL101-NH₂ 的 X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)测定, 如图 4(e)所示, MIL101-NH₂ 的 XRD 图谱中的特征衍射峰位置与 MIL-101 标准卡片及文献[49]报道的 MIL101-NH₂数据高度一致, 证实其高结晶度。负载 Pt 纳米颗粒后, 主衍射峰位置仅发生微小偏移, 表明 Pt 负载未显著改变 MOF 骨架的晶体结构。XRD 图谱中未检测到 Pt 的特征峰, 推测因 Pt 纳米颗粒尺寸较小且高度分散。

综合这些表征结果可以表明成功构建了形貌良好、结构稳定且均匀负载 Pt 纳米粒子的 Pt@MIL101-NH₂ 复合材料。



注: (a)为 MIL101-NH₂ 的 SEM 图; (b)为 Pt@MIL101-NH₂ 的 TEM 图; (c)(d)为 Pt@MIL101-NH₂ 的 HRTEM 图; (e)为 MIL101-NH₂ 和 Pt@MIL101-NH₂ 的 XRD 图。

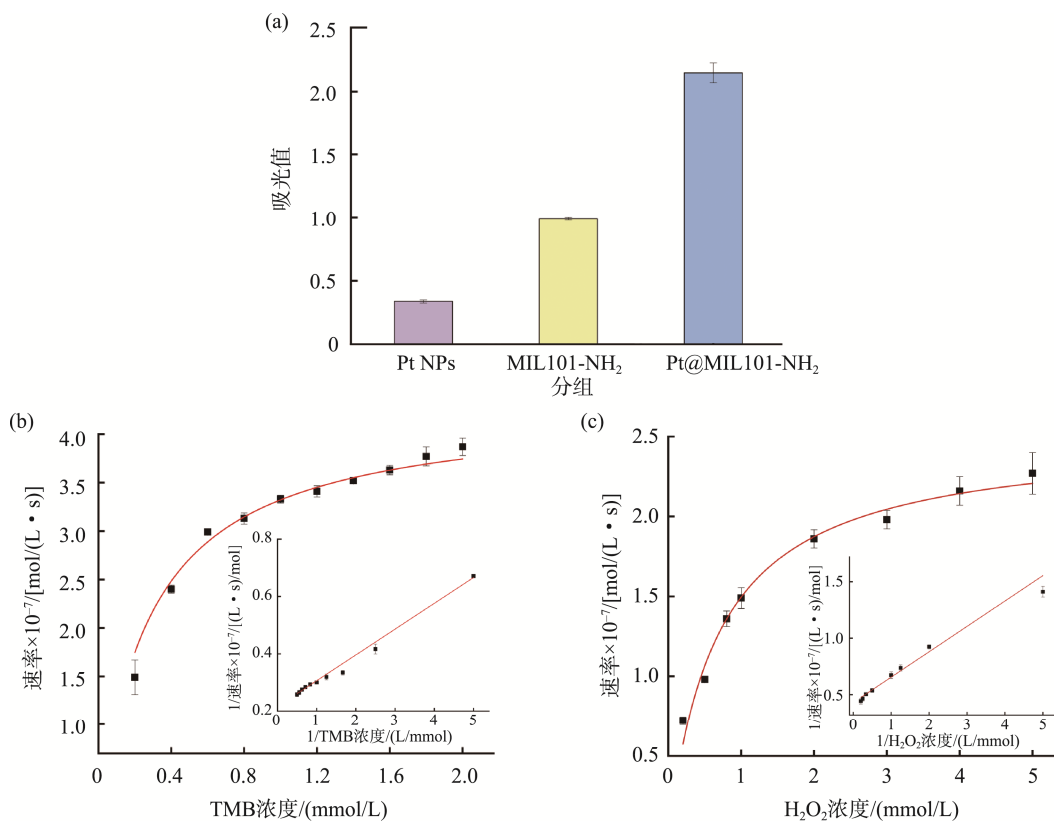
图 4 MIL101-NH₂ 和 Pt@MIL101-NH₂ 的表征Fig.4 Characterization of MIL101-NH₂ and Pt@MIL101-NH₂

以 TMB 为反应底物分别测定 Pt NPs、MIL101-NH₂ 和负载 Pt NPs 后的复合纳米酶催化 H₂O₂ 氧化 TMB 活性的能力。如图 5(a)所示结果, Pt@MIL101-NH₂ 较 MIL101-NH₂ 的催化活性提升约 1 倍, 其类过氧化物酶活性得到了明显的改善。这些结果表明了在 Pt NPs 和 MIL101-NH₂ 的两种组分之间存在良好的协同催化作用。在催化过程中 Pt 纳米粒子作为电子供体, 部分电子通过界面转移至 Fe³⁺, 加速了催化反应的速率控制步骤—Fe³⁺→Fe²⁺还原^[50], 进而与 Fe 协同增强了材料的类过氧化物酶活性。

基于米氏方程对 Pt@MIL101-NH₂ 催化 H₂O₂ 氧化 TMB 动力学参数进行测定。分别固定 TMB 和 H₂O₂ 浓度, 测定催化 H₂O₂ 氧化 TMB 的动力学曲线。通过分析图 5(b)和图 5(c)计算出纳米酶的米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max}, K_m 值越小, 表明酶对底物的亲和力越好。以米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{max} 分析, Pt@MIL101-NH₂ 对底物 TMB 的 K_m 值为 0.29 mmol/L, V_{max} 值为 4.28×10⁻⁷ mol/(L·s), 对底物 H₂O₂ 的 K_m 值为 0.67 mmol/L, V_{max} 值为 2.50×10⁻⁷ mol/(L·s)。与天然酶对比可知^[51], Pt@MIL101-NH₂ 对两种反应底物的 K_m 值均低于天然酶, V_{max} 值高于天然酶。上述数据表明 Pt@MIL101-NH₂ 相对于 HRP 表现出更为优异的催化活性。这证明了 Pt@MIL101-NH₂ 作为纳米酶的潜力。

基于抗体羧基与 PDA 表面丰富的醛基结构共价偶联的特性, 本研究借助 PDA 在 Pt@MIL-101-NH₂ 表面的包覆构建了 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 免疫探针。为优化探针性能, 系统考察了盐酸多巴胺添加量(1~40 mg)对材料催化活性的影响。如图 6(a)所示, 随着 DA-HCl 添加量从 1 mg 增至 20 mg, 材料催化活性缓慢降低, 然而当 DA-HCl 量超过 20 mg 时, 催化活性急剧下降, 推测过厚的 PDA 层会阻塞 MOF 介孔通道, 限制 H₂O₂ 和 TMB 分子向活性位点的扩散, 并削弱 Pt 纳米颗粒与 Fe 节点的电子协同效应。综合考虑催化活性与抗体标记位点数量的平衡, 最终选择 20 mg DA-HCl 作为最佳修饰用量, 在保持材料高催化活性的同时, 为抗体固定提供充足反应位点。

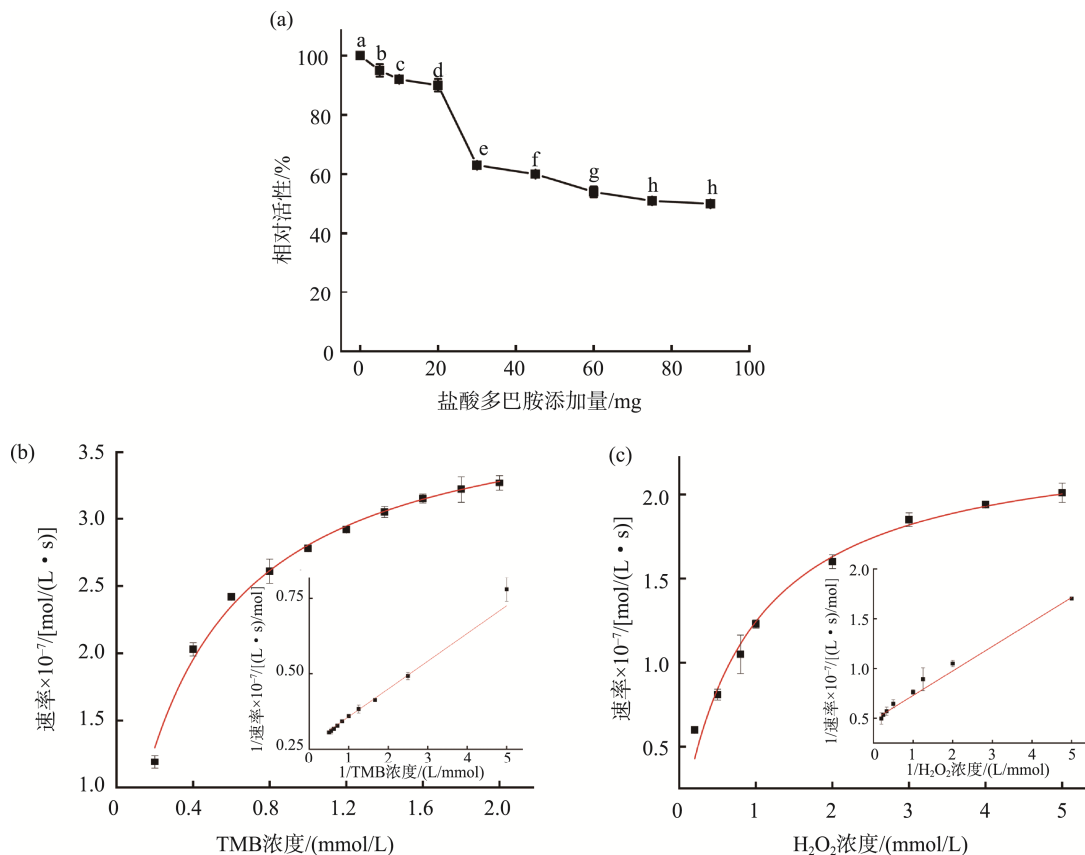
对 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 进行酶的稳态动力学分析结果如图 6(b)和图 6(c)所示, 反应底物浓度与反应速率呈现典型酶促反应特征。TMB 体系显示其 V_{max} 高达 4.62×10⁻⁷ mol/(L·s), K_m 为 0.42 mmol/L, 而 H₂O₂ 体系的 V_{max} 为 2.1×10⁻⁷ mol/(L·s), K_m 为 0.51 mmol/L。对比分析发现, 与 Pt@MIL101-NH₂ 原始体系相比, 其 V_{max} 与 K_m 数值无显著差异, 进一步表明 PDA 介导的抗体固定化过程未显著屏蔽活性位点, 材料实现了催化活性与抗体固定功能的兼容。



注: (a)为 Pt NPs、MIL101-NH₂ 和 Pt@MIL101-NH₂ 催化氧化 TMB 后在 652 nm 下的吸光值; (b)为 Pt@MIL101-NH₂ 对 TMB 的动力学分析; (c)为 Pt@MIL101-NH₂ 对 H₂O₂ 的动力学分析。

图 5 Pt@MIL101-NH₂ 的类过氧化物酶活性表征

Fig.5 Characterization of peroxidase-like activity of Pt@MIL-101-NH₂



注: (a)为盐酸多巴胺添加量对 Pt@MIL101-NH₂ 催化活性的影响(不同小写字母表示单因素方差分析后的组间显著性差异, $P < 0.05$); (b)为 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 对 TMB 的动力学分析; (c)为 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 对 H₂O₂ 的动力学分析。

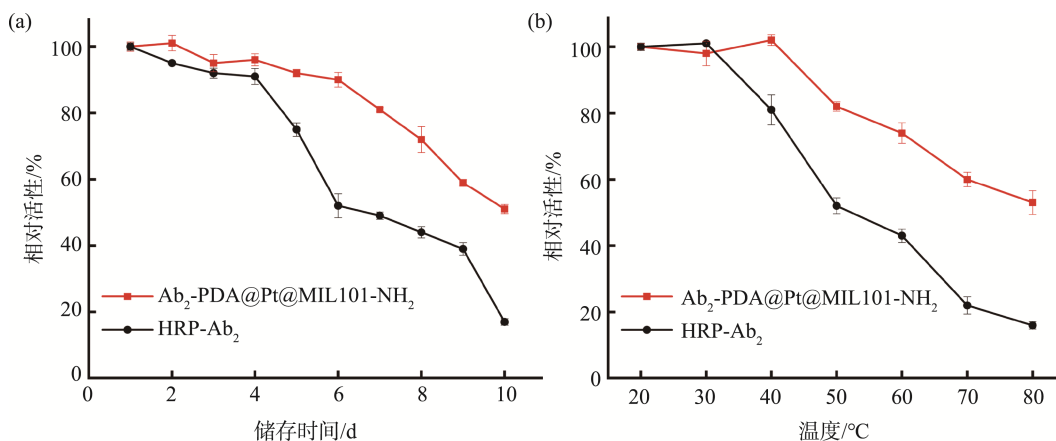
图 6 PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的类过氧化物酶活性表征

Fig.6 Characterization of peroxidase-like activity of PDA@Pt@MIL-101-NH₂

2.3 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的稳定性

免疫传感器的分析性能与酶的稳定性和抗体的生物活性密切相关。因此本研究探究了不同条件下 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的生物活性, 并与 HRP-Ab₂ 进一步进行了相应的对比。图 7(a)显示随着储存天数的增加,

直至到达室温储存 10 d 时, HRP-Ab₂ 的活性损失了 80%以上而 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的相对生物活性还保持在 50%左右。图 7(b)显示随着温度从 20 °C 逐步升高至 80 °C, HRP-RlgG 的生物活性仅可以保持在 15%左右, 但是相同条件下 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的生物活性仍



注: (a)为室温下储存时间; (b)为用不同温度处理 60 min。

图 7 不同条件下 HRP-Ab₂ 和 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 生物活性的变化

Fig.7 Changes in the biological activity of HRP-Ab₂ and Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ under different conditions

可以保持超过 50%。这些结果表明 PDA@Pt@MIL101-NH₂ 作为载体提高了免疫探针的耐长期储存和耐高温稳定性, Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 与传统的酶标抗体相比耐高温和耐长期储存的性能得到改善。这对 ELISA 在检测痕量目标物中的应用有益^[52]。

2.4 夹心 ELISA 检测方法的特异性检测

将 5 μg/mL 的大肠杆菌 O55:B5 LPS 作为阳性样品, 其他类似物浓度设置为 10 μg/mL 进行检测。如图 8 所示, 抗体仅与大肠杆菌 O55:B5 来源的 LPS 产生特异性结合, 对其他相似物基本没有交叉反应。这表明通过囊泡免疫策略制备的多克隆抗体对大肠杆菌 O55:B5 血清型 LPS 具有高度特异性识别能力。大肠杆菌 O55:B5 作为肠致病性大肠杆菌的重要血清型, 其污染广泛存在于饮用水处理、肉类加工及乳制品生产等食品链关键环节。值得注意的是, 该菌株被美国食品药品监督管理局列为 LPS 检测的标准菌株^[53], 针对该血清型的特异性检测方法能为污染溯源、风险评估提供依据。

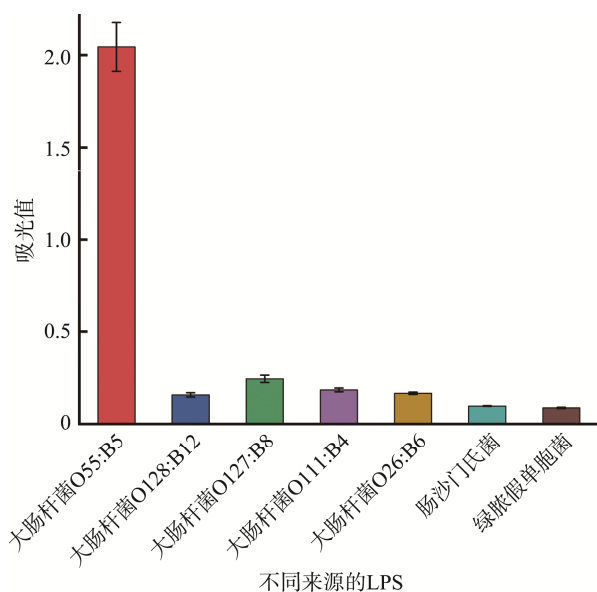


图 8 夹心 ELISA 方法特异性检测
Fig.8 Specificity detection by sandwich ELISA method

2.5 基于 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的 ELISA 检测 LPS 的灵敏度测定

对 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 的 ELISA 体系进行条件优化。棋盘法实验结果表明 PMB 最佳包被质量浓度为 25 μg/mL, LPS 多克隆抗体的最佳稀释倍数为 1:1000, 选择 5% BSA 为最适封闭剂。

在优化反应条件下, 通过建立 LPS 质量浓度与氧化 TMB 在 450 nm 处吸光度的标准曲线(图 9), 验证该方法的分析性能。结果表明, Pt@MIL101-NH₂-ELISA 体系在

20~2000 ng/mL 质量浓度范围内呈现良好的线性响应 ($r^2=0.9776$), LPS 的检出限估计为 5 ng/mL ($P:N=2.1:1$)。与只含酶标二抗 HRP-IgG 的传统 ELISA 方法相比, 该方法检出限降低了 4 倍, 这一差异表明 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂ 比 HRP-IgG 具有更好的传感性能, 体现出其在痕量 LPS 检测中更卓越的分析性能。

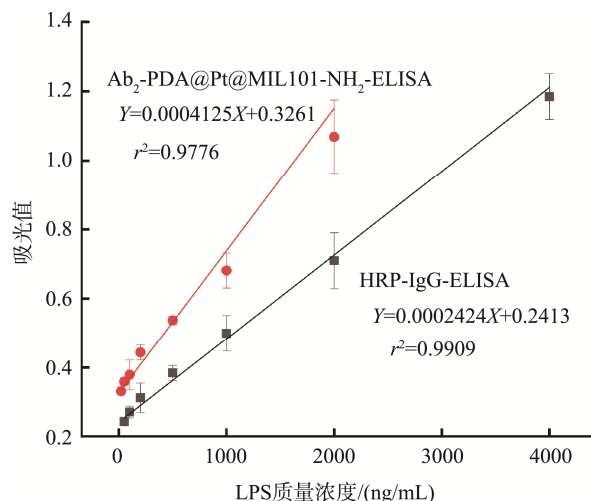


图 9 Ab₂-PDA@Pt@MIL101-NH₂-ELISA 和 HRP-IgG-ELISA 检测 LPS 的标准曲线

Fig.9 Standard curves for LPS detection by Ab₂-PDA@Pt@MIL-101-NH₂-ELISA and HRP-IgG-ELISA

2.6 实际样本的检测

通过加标回收实验评估 Pt@MIL101-NH₂-ELISA 方法在食品基质中的适用性。由于饮用水污染是大肠杆菌 O55:B5 的重要传播途径, 本研究选取两种具有代表性的饮品作为食品基质进行验证。结果显示(表 1), 苹果汁中 LPS 的回收率为 90.38%~93.96%, 啤酒中为 96.85%~105.71%, 所有样本的回收率均接近理论值 (100%±10%), 表明检测体系受基质干扰较小。进一步分析重复性参数, 苹果汁与啤酒样本的相对标准偏差分别为 1.58%~4.53%和 1.02%~3.83%, 证明该方法具有良好的批内精密度, 表明本研究建立的 Pt@MIL101-NH₂-ELISA 方法对饮品样本中 LPS 的分析检测可靠。该方法准确度高、重复性好, 可用于实际样品的检测。

表 1 不同样本的回收率($n=3$)
Table 1 Recovery rates of different samples ($n=3$)

样品	加样质量浓度 /(ng/mL)	检测质量浓度 /(ng/mL)	回收率 /%	相对标准偏差 /%
苹果汁	200	182.90±3.29	91.45	1.80
	500	451.89±20.47	90.38	4.53
	1000	939.56±14.80	93.96	1.58
啤酒	200	211.41±8.11	105.71	3.83
	500	484.49±6.58	96.90	1.36
	1000	968.52±9.89	96.85	1.02

3 讨论与结论

本研究通过 OMVs 免疫策略, 避免了 LPS 作为免疫原不能诱导免疫记忆的缺陷, 成功制备了效价达 1:256000 的 LPS 多克隆抗体, 并结合 PMB 对 LPS 的特异性强吸附, 进一步引入 Pt@MIL101-NH₂ 复合纳米酶作为信号标记物构建了新型比色免疫传感器, 实现对 LPS 的特异性检测。同时 Pt@MIL101-NH₂ 复合纳米酶的标记提升了检测性能, 构建的方法针对 LPS 的检出限为 5 ng/mL, 灵敏度较 HRP 标记的传统 ELISA 方法提高 4 倍, 且在苹果汁和啤酒样本中回收率达 90.38%~105.71%, 验证了方法的实际适用性。相较于传统 ELISA 依赖天然酶的局限性, 本研究提出的纳米酶标记策略为免疫分析提供了更稳定、灵敏的替代方案。与现有 LAL 法相比, 该方法避免了珍稀生物资源依赖和基质干扰, 具有更高的普适性和可操作性, 在食品、药品和环境样本的现场快速检测中具有广阔的实际应用前景。本研究中制备的 LPS 抗体存在着仅适用于目标菌株(大肠杆菌 O55:B5) LPS 的精准检测, 对其他血清型大肠杆菌或革兰氏阴性菌的 LPS 无交叉反应的局限。未来可进一步开发基因工程改造的 OMVs 载体, 使 OMVs 定向展示高免疫原性 LPS 保守表位, 诱导针对脂质 A/核心多糖的广谱抗体, 提升检测普适性。

参考文献

- [1] GNAUCK A, LENTLE RG, KRUGER MC. The characteristics and function of bacterial lipopolysaccharides and their endotoxic potential in humans [J]. *International Reviews of Immunology*, 2015, 35(3): 189–218.
- [2] RAETZ CRH, WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, 71: 635–700.
- [3] GARCIA-VELLO P, DI-LORENZO F, ZUCCHETTA D, *et al.* Lipopolysaccharide lipid A: A promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022, 230: 107970.
- [4] HOLST O, ULMER AJ, BRADE H, *et al.* Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins [J]. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 1996, 16(2): 83–104.
- [5] SONDHI P, ADENIJI T, LINGDEN D, *et al.* Advances in endotoxin analysis [J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2024, 118: 1–34.
- [6] JACKIE J, LAU WK, FENG HT, *et al.* Detection of endotoxins: From inferring the responses of biological hosts to the direct chemical analysis of lipopolysaccharides [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2019, 49(2): 126–137.
- [7] BOLDEN JS, WARBURTON RE, PHELAN R, *et al.* Endotoxin recovery using *limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay [J]. *Biologicals*, 2016, 44(5): 434–440.
- [8] KIM JH, JUNG K, KIM J, *et al.* Development of a rabbit monocyte activation test as an alternative to the rabbit pyrogen test and its application in the analysis of plasma-derived products [J]. *Biologicals*, 2021, 71: 20–30.
- [9] CHALUPNIAK A, WASZCZUK K, HALUBEK-GLUCHOWSKA K, *et al.* Application of quartz tuning forks for detection of endotoxins and gram-negative bacterial cells by monitoring of *limulus* amoebocyte lysate coagulation [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 58: 132–137.
- [10] HURLEY JC. Endotoxemia-methods of detection and clinical correlates [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995, 8(2): 268–292.
- [11] DOBROVOLSKAIA MA, NEUN BW, CLOGSTON JD, *et al.* Ambiguities in applying traditional *limulus* amoebocyte lysate tests to quantify endotoxin in nanoparticle formulations [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2010, 5(4): 555–562.
- [12] REEN DJ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1994, 32: 461–466.
- [13] GAO ZQ, HOU L, XU MD, *et al.* Enhanced colorimetric immunoassay accompanying with enzyme cascade amplification strategy for ultrasensitive detection of low-abundance protein [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 3966.
- [14] VOKHMYANINA DV, ANDREEVA KD, KOMKOVA MA, *et al.* ‘Artificial peroxidase’ nanozyme-enzyme based lactate biosensor [J]. *Talanta*, 2020, 208: 120393.
- [15] NAVARRO A, HERNÁNDEZ-CHIÑAS U, LICONA-MORENO D, *et al.* Immunogenic peptide mimotopes from an epitope of *Escherichia coli* O157 LPS [J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(21): 3791–3804.
- [16] ULEVITCH RJ, TOBIAS PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1999, 11(1): 19–22.
- [17] LEE YH, JANG YH, BYUN YH, *et al.* Green tea catechin-inactivated viral vaccine platform [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2469.
- [18] SUNDARAM AK, EWING D, BLEVINS M, *et al.* Comparison of purified psoralen-inactivated and formalin-inactivated dengue vaccines in mice and nonhuman primates [J]. *Vaccine*, 2020, 38(17): 3313–3320.
- [19] SCHWECHHEIMER C, KUEHN MJ. Outer-membrane vesicles from gram-negative bacteria: Biogenesis and functions [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(10): 605–619.
- [20] VAN-DER-POL L, STORK M, VAN-DER-LEY P. Outer membrane vesicles as platform vaccine technology [J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(11): 1689–1706.
- [21] KAPARAKIS-LIASKOS M, FERRERO RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(6): 375–387.
- [22] VANAJA SK, RUSSO AJ, BEHL B, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation [J]. *Cell*, 2016, 165(5): 1106–1119.
- [23] GILMORE WJ, JOHNSTON EL, BITTO NJ, *et al.* *Bacteroides fragilis* outer membrane vesicles preferentially activate innate immune receptors compared to their parent bacteria [J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 970725.
- [24] BAN WY, SUN MC, HUANG HW, *et al.* Engineered bacterial outer membrane vesicles encapsulating oncolytic adenoviruses enhance the efficacy of cancer virotherapy by augmenting tumor cell autophagy [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 2933.
- [25] TAMBURINI S, ZHANG YR, GAGLIARDI A, *et al.* Bacterial outer membrane vesicles as a platform for the development of a broadly protective human papillomavirus vaccine based on the minor capsid protein L2 [J]. *Vaccines*, 2023, 11(10): 1582.
- [26] GU L, MENG R, TANG Y, *et al.* Toll-like receptor 4 signaling licenses the cytosolic transport of lipopolysaccharide from bacterial outer membrane vesicles [J]. *Shock*, 2019, 51(2): 256–265.
- [27] FURUKAWA H, CORDOVA KE, O'KEEFFE M, *et al.* The chemistry and

- applications of metal-organic frameworks [J]. *Science*, 2013, 341(6149): 974.
- [28] STOCK N, BISWAS S. Synthesis of metal-organic frameworks (MOFs): Routes to various mof topologies, morphologies, and composites [J]. *Chemical Reviews*, 2012, 112(2): 933–969.
- [29] LUSTIG WP, MUKHERJEE S, RUDD ND, *et al.* Metal-organic frameworks: Functional luminescent and photonic materials for sensing applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(11): 3242–3285.
- [30] HUANG X, ZHANG ST, TANG YJ, *et al.* Advances in metal-organic framework-based nanozymes and their applications [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 449: 214216.
- [31] YUAN AI, LU YW, ZHANG XD, *et al.* Two-dimensional iron MOF nanosheet as a highly efficient nanozyme for glucose biosensing [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(40): 9295–9303.
- [32] WANG KC, FENG DW, LIU TF, *et al.* A series of highly stable mesoporous metalloporphyrin Fe-MOFs [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(40): 13983–13986.
- [33] SONG W, ZHAO B, WANG C, *et al.* Functional nanomaterials with unique enzyme-like characteristics for sensing applications [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, 7(6): 850–875.
- [34] WANG N, LI ZX, WU XS, *et al.* A novel and sensitive microneedle array platform for visual detection of glucose based on Zr-MOF@Pt nanozyme with peroxidase-like activity [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 203: 110954.
- [35] LING PH, CHENG S, CHEN N, *et al.* Nanozyme-modified metal-organic frameworks with multienzymes activity as biomimetic catalysts and electrocatalytic interfaces [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(15): 17185–17192.
- [36] WU P, GONG FJ, FENG XL, *et al.* Multimetallic nanoparticles decorated metalorganic framework for boosting peroxidaselike catalytic activity and its application in point-of-care testing [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 185.
- [37] LEE H, RHO J, MESSERSMITH PB. Facile conjugation of biomolecules onto surfaces via mussel adhesive protein inspired coatings [J]. *Advanced Materials*, 2009, 21(4): 431–434.
- [38] LI R, BU T, ZHAO Y, *et al.* Polydopamine coated zirconium metal-organic frameworks-based immunochromatographic assay for highly sensitive detection of deoxynivalenol [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1131: 109–117.
- [39] 田秀梅, 陈晓阳, 杨天宝, 等. 聚多巴胺侧流免疫层析法检测谷物中呕吐毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2025, 16(4): 62–70.
TIAN XM, CHEN XY, YANG TB, *et al.* Detection of the deoxynivalenol in cereals by polydopamine-based lateralflow immunochromatography assay [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2025, 16(4): 62–70.
- [40] DING SJ, CHANG BW, WU CC, *et al.* A new method for detection of endotoxin on polymyxin B-immobilized gold electrodes [J]. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9(5): 1206–1211.
- [41] ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G [J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871–874.
- [42] TAHA AA, HUANG L, RAMAKRISHNA S, *et al.* MOF [NH₂-MIL-101(Fe)] as a powerful and reusable Fenton-like catalyst [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2020, 33: 101004.
- [43] HORCAJADA P, CHALATI T, SERRE C, *et al.* Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging [J]. *Nature Materials*, 2010, 9(2): 172–178.
- [44] LIU C, XING J, AKAKURU OU, *et al.* Nanozymes-engineered metal-organic frameworks for catalytic cascades-enhanced synergistic cancer therapy [J]. *Nano Letters*, 2019, 19(8): 5674–5682.
- [45] HOU J, WAN J, YAN Z, *et al.* A novel polydopamine-modified metal organic frameworks catalyst with enhanced catalytic performance for efficient degradation of sulfamethoxazole in wastewater [J]. *Chemosphere*, 2022, 297: 134100.
- [46] ZHANG G, DENG SL, FANG BL, *et al.* Lateral flow immunoassay based on polydopamine-coated metal-organic framework for the visual detection of enrofloxacin in milk [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(24): 7315–7323.
- [47] 李生, 吕娟, 胡格, 等. 大肠杆菌内毒素多克隆抗体的制备与纯化[J]. *中国农学通报*, 2007(11): 16–19.
LI S, LV J, HU G, *et al.* Preparation and purification of polyclonal antibodies against LPS of *E. coli* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007(11): 16–19.
- [48] 周卓晟, 罗中捷, 郝春慧, 等. 内毒素多克隆抗体制备及其在 ELISA 中应用[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(11): 1467–1469.
ZHOU ZS, LUO ZJ, HAO CH, *et al.* Preparation of polyclonal antibody against *E. coli* endotoxin and application of icELISA [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2012, 28(11): 1467–1469.
- [49] DAO XY, XIE XF, GUO JH, *et al.* Boosting photocatalytic CO₂ reduction efficiency by heterostructures of NH₂-MIL-101 (Fe)/g-C₃N₄ [J]. *Acs Applied Energy Materials*, 2020, 3(4): 3946–3954.
- [50] RAJA DS, CHUAH XF, LU SY. In situ grown bimetallic mof-based composite as highly efficient bifunctional electrocatalyst for overall water splitting with ultrastability at high current densities [J]. *Advanced Energy Materials*, 2018, 8(23): 1801065.
- [51] GAO LZ, ZHUANG J, NIE L, *et al.* Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles [J]. *Nature Nanotechnology*, 2007, 2(9): 577–583.
- [52] ZHAO Q, LU D, ZHANG GY, *et al.* Recent improvements in enzyme-linked immunosorbent assays based on nanomaterials [J]. *Talanta*, 2021, 223: 121722.
- [53] PEARSON FC, WEARY ME, SARGENT HE, *et al.* Comparison of several control standard endotoxins to the national reference standard endotoxin—an HIMA collaborative study [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(1): 91–93.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)