

重金属镉特异性抗体的制备及 icELISA 检测方法的建立

柳心梅¹, 田巍², 冯春梅¹, 罗林¹, 孙远明¹, 肖治理¹

(1. 广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

(2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

摘要: 为检测食品中的重金属镉残留问题, 本研究建立了基于重金属镉抗体的酶联免疫分析方法。利用异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 (Isothiocyanobenzyl-EDTA, ITCBE) 螯合 Cd^{2+} 并偶联牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清白蛋白 (OVA), 合成了针对 Cd^{2+} 的免疫原 Cd-ITCBE-BSA 和包被原 Cd-ITCBE-OVA, 通过紫外扫描鉴定说明偶联成功; 以 Cd-ITCBE-BSA 免疫 Balb/c 小鼠, 制备出 Cd^{2+} 抗血清并对其免疫学特性进行鉴定, 进一步说明了抗原合成成功, 在此基础上进行了条件优化并建立了针对镉的 icELISA 检测方法。方法的检测限 (IC_{10}) 为 0.18 ng/mL, IC_{50} 为 1.15 ng/mL, 线性检测范围 ($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$) 为 0.24~5.54 ng/mL。除了与 Hg^{2+} 有 2.16% 的交叉反应率, 该方法对 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Cr^{3+} 交叉反应率均小于 0.3%, 板内变异系数和板间变异系数都低于 10%。此抗体特异性强灵敏度高, 建立的 icELISA 方法可应用于食品中重金属镉的快速检测。

关键词: 镉; 人工抗原; 抗血清; icELISA

文章编号: 1673-9078(2020)08-325-332

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0118

Preparation of Specific Antibody to Cadmium and Establishment of icELISA Detection Method

LIU Xin-mei¹, TIAN Wei², FENG Chun-mei¹, LUO Lin¹, SUN Yuan-ming¹, XIAO Zhi-li¹

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

(2. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of heavy metal Cadmium ion (Cd^{2+}) residues in food was established. ITCBE was coupled with Cd^{2+} and conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to obtain Cd-ITCBE-BSA as immunogen and Cd-ITCBE-OVA as coating antigen, which were identified by ultraviolet spectrum (UV). Cd-ITCBE-BSA was injected to Balb/c mice to produce antiserum. The immunological characteristics of the antiserum were identified, which further proved the success of synthesis. On this basis, an ic-ELISA was established after optimizing the conditions. The limit of detection (IC_{10}) was 0.18 ng/mL, the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was 1.15 ng/mL, and the linear range ($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$) was 0.24~5.54 ng/mL. Except for a cross-reactivity of 2.16% with Hg^{2+} , the cross-reactivity with Pb^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} and Cr^{3+} were all less than 0.3%. The coefficients of variation within and between plates were both less than 10%. This antibody has strong specificity and high sensitivity, and the established ELISA method can be applied to the rapid detection of heavy metal cadmium in food.

Key words: cadmium; artificial antigen; antiserum; icELISA

引文格式:

柳心梅, 田巍, 冯春梅, 等. 重金属镉特异性抗体的制备及 icELISA 检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2020, 36(8): 325-332

LIU Xin-mei, TIAN Wei, FENG Chun-mei, et al. Preparation of specific antibody to cadmium and establishment of icELISA detection method [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 325-332

收稿日期: 2020-02-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602903); 广东省科技计划项目 (2014B070706001)

作者简介: 柳心梅 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全

通讯作者: 肖治理 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品质量与安全

镉是一种强毒性重金属^[1], 其主要通过食物链的富集作用进入人体^[2], 对骨骼、肝脏、肾脏、心血管、生殖系统等有很大的毒性作用^[3], 在人体内的半衰期长达 10~35 年^[4]。历史上发生过许多镉污染环境进而危害人体健康的事件, 例如 1931 年日本发生的“痛痛病”事件^[5]、2012 年广西龙江重金属镉污染事件^[6]。国家标准 GB 2762-2017《食品安全标准 食品中污染物限量》规定重金属镉在谷物和豆类中的最大残留限量为 0.1 mg/kg, 在新鲜蔬菜和蛋及蛋制品中的最大残留限量为 0.05 mg/kg。在国外, 世界卫生组织 (WHO) 和联合国粮农组织 (FAO) 于 1973 年先后把镉列为必须要研究的污染物^[7]; 1974 年, 联合国环境规划署在会议上将镉定为重点污染物^[8]; 2010 年, WHO 提出了人类每周耐受摄入镉的量为 7 mg/kg^[9]。

检测重金属的常用方法有: 原子荧光光谱法^[10,11], 电感耦合等离子体质谱法^[12], X 射线荧光光谱分析法^[13], 原子吸收法^[14], 溶出伏安法^[15]等。这些方法精确度较高, 但需要依赖仪器和专业技术人员, 所以具有一定局限性。建立快速、低成本、特异性强、灵敏度高、操作简便的重金属免疫分析方法是近年来科研人员研究的热点^[16,17]。该方法依据抗原与抗体的特异性识别原理建立, 借助双功能螯合剂作为桥梁, 将不具免疫原性的镉离子与载体蛋白偶联, 得到完全抗原^[18], 进而引起动物免疫反应。免疫分析法近年来发展迅速, 应用广泛, 如 He 等^[19]、Darwish 等^[20]、刘艳梅等^[1]、苏芳等^[21]均建立了镉的 ELISA 检测方法。

本文利用异硫氰酸苄基乙二胺四乙酸 (Isothiocyanobenzyl-EDTA, ITCBE) 作为双功能螯合剂, 合成镉离子完全抗原, 制备针对镉离子的抗血清, 并建立 icELISA 检测方法, 实现对镉离子的快速、灵敏检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂

牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、Tween-20、弗氏完全佐剂 (FCA)、弗氏不完全佐剂 (FIA)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (IgG-HRP), Sigma 公司; 乙二胺四乙酸 (EDTA)、二甲基亚砜 (DMSO), 广州化学试剂厂; ITCBE, 上海同仁化学研究所; TMB 显色液, 广州万联生物科技有限公司; Cd 标准品、Hg 标准品、Pb 标准品、Fe 标准品、Cr 标准品、Cu 标准品, Sigma 公司; 其余化学试剂均为国产分析纯。

磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, NaCl 8.5 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g/L), 碳酸盐缓冲液 (CBS, pH 9.6, Na₂CO₃ 1.69 g/L, NaHCO₃ 2.95 g/L), 封闭液 (0.5%脱脂奶粉溶液), HBS 缓冲液 (8 g/L NaCl, 2.38 g/L HEPES, 0.2 g/L KCL), Tris-HCl 缓冲液 (1.2 g/L 三羟基甲烷, 4.2% 0.1 mol/L HCl), PBST 缓冲液 (含 0.1% Tween-20 的 PBS), 终止液 (10% H₂SO₄)。

1.1.2 仪器与设备

磁力搅拌器, 德国 IKA 公司; 微量振荡器, 常州澳华有限公司; 台式高速冷冻离心机、微量可调移液器, Eppendorf 公司; 电热恒温鼓风干燥箱, 黄石市恒丰医疗器械有限公司; 电子分析天平, 梅特勒公司; 酶标板, 深圳金灿华实业有限公司; DEM-3 型自动洗板机、微量紫外可见分光光度计, 美国 Thermo 公司; Multiskan MK3 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; MFI-A10 超纯水机, Costar 公司; 透析袋 (截留分子量 8000~10000 u): Sigma 公司。

1.1.3 试验动物

雌性 Balb/c 小鼠: 8 周龄 SPF 级, 广东省医学实验动物中心 (三水基地)。

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的合成^[22]

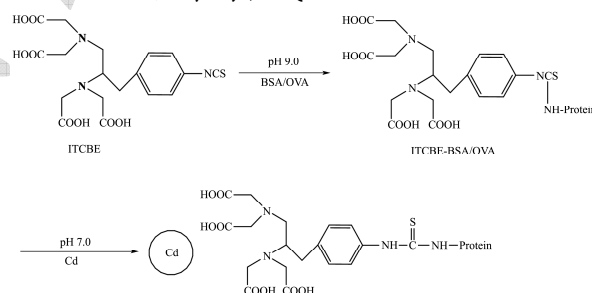


图 1 Cd-ITCBE-BSA/OVA 合成路线图

Fig.1 Synthesis procedure of Cd-ITCBE-BSA/OVA^[22]

取 2.0 mg ITCBE 溶于 200 μ L DMSO; 取 20.0 mg BSA (OVA) 溶于 500 μ L 0.01 mol/L PBS (pH 9.0) 中。然后将 ITCBE 溶液缓慢滴加到 BSA (OVA) 蛋白溶液中, 在室温条件下搅拌反应 24 h。反应结束后, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 透析 3 d, 得到 ITCBE-BSA (ITCBE-OVA)。

向 ITCBE-BSA (ITCBE-OVA) 溶液中缓慢滴加 1 mg/mL 的 Cd²⁺标准品 1.1 mL, 边滴加边振荡, 调节 pH=7.0, 室温搅拌反应 3 h, 得到 Cd-ITCBE-BSA (Cd-ITCBE-OVA) 溶液, 分装在离心管中, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

1.2.2 人工抗原的鉴定

紫外扫描鉴定：用紫外可见分光光度计在200~400 nm 范围内进行扫描，鉴定半抗原是否与载体蛋白偶联^[23]。

1.2.3 动物免疫

选择3只8周龄的Balb/c小鼠，以50 μg/只的剂量，在小鼠腹部、背部、足垫等多处进行皮下注射，初次免疫将Cd-ITCBE-BSA与等量FCA混合。以后间隔2周加强免疫1次，将Cd-ITCBE-BSA与等量FIA混合。从第三次免疫开始每次免疫7 d后断尾取血，离心，取上清，测定效价和抑制率。

1.2.4 抗血清的测定

用Cd-ITCBE-OVA为包被原，采用icELISA方法测定血清的效价和抑制率。用CBS将Cd-ITCBE-OVA稀释一定倍数，100 μL/孔，于37℃水浴箱中孵育12 h，PBST洗2次。加入封闭液120 μL/孔，37℃封闭3 h，PBST洗板5次。效价列每孔加入50 μL倍比稀释的抗血清和50 μL PBS；抑制列每孔加入50 μL倍比稀释的抗血清和50 μL浓度为1 μg/mL Cd-EDTA药物。用空白血清作为阴性对照，37℃孵育40 min，PBST洗板5次，再加入100 μL/孔辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG (1:5000)，37℃反应30 min。PBST洗板5次，加入TMB显色液100 μL/孔，37℃显色10 min后，每孔加入50 μL终止液，测定450 nm吸光度。以 $P/N \geq 2.1$ 对应的最大稀释倍数为抗血清效价，其中P为阳性血清的OD_{450 nm}，N为阴性血清的OD_{450 nm}。抑制率的计算如下：

$$\text{抑制率}/\% = \frac{B_0 - B}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

其中， B_0 为不加药物时的吸光度，B为加入一定浓度药物抑制时的吸光度。

1.2.5 icELISA 检测方法的建立

(1) icELISA方法优化：依据文献步骤^[24-26]，本研究采用棋盘法筛选包被原浓度和抗血清稀释倍数组合，然后选择 IC_{50} 最低的组合作为最佳组合，再分别对缓冲液种类、EDTA浓度、竞争反应时间、二抗稀释液、二抗稀释倍数、二抗反应时间进行优化。用最大吸光值(A_{max})、半抑制浓度(IC_{50})和 A_{max}/IC_{50} 这三个指标进行判定，选择 IC_{50} 最低， A_{max}/IC_{50} 最高的条件来建立标准曲线。

(2) icELISA标准曲线的建立^[27-29]：在最优条件下，以Cd-EDTA系列浓度(400 ng/mL、80 ng/mL、16 ng/mL、3.2 ng/mL、0.64 ng/mL、0.128 ng/mL、0.0256 ng/mL)的对数值为横坐标，以 B/B_0 为纵坐标，用

Origin 9.0 软件绘制标准曲线，并计算相应的检测限(IC_{10})，半抑制浓度(IC_{50})，线性检测范围($IC_{20} \sim IC_{80}$)^[26,30]。

1.2.6 方法特异性试验

制备的抗体识别镉离子与其他金属离子(抗原结构类似物)的特异性可以用交叉反应率(Cross Reactivity, CR)来表示，即待测抗原的 IC_{50} 与结构类似物的 IC_{50} 之百分比值(见式2)。对镉离子结构类似物的CR越小，表明该方法的特异性越好^[31]。

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}(\text{镉离子})}{IC_{50}(\text{其他金属离子})} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.7 方法稳定性试验^[32-35]

为了测试该方法的稳定性，配制4种不同浓度(200 ng/mL、40 ng/mL、8 ng/mL、1.6 ng/mL)的Cd-EDTA稀释液，在同一块酶标板上利用本研究建立的icELISA方法进行检测，每个浓度重复3次，测得平均抑制率和标准差(SD)，计算板内变异系数。

准备好3批不同时间包被并封闭的酶标板，分别在37℃烘箱中放置1、6、15 d，然后每块板进行以上4种浓度药物的icELISA检测，每个浓度重复3次，再计算3块板的平均抑制率和标准差，计算板间变异系数。

2 结果与分析

2.1 人工抗原鉴定

为验证镉离子人工抗原偶联是否成功，分别对BSA/OVA、Cd-ITCBE和Cd-ITCBE-BSA/Cd-ITCBE-OVA进行紫外扫描，结果如图2、图3所示。在图2中BSA在227 nm和279 nm处各有一个特征吸收峰，半抗原Cd-ITCBE在234 nm处有一个吸收峰，而完全抗原Cd-ITCBE-BSA在225 nm和270 nm有2个吸收峰，三条曲线几乎不重叠。

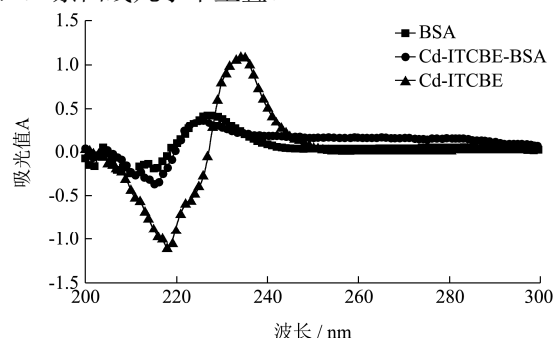


图2 BSA、Cd-ITCBE、Cd-ITCBE-BSA 紫外扫描图

Fig.2 UV spectrum of BSA、Cd-ITCBE、Cd-ITCBE-BSA

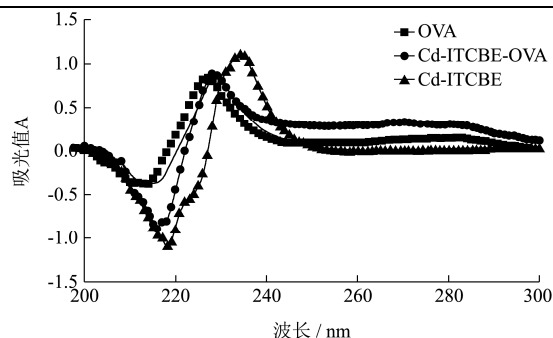


图3 OVA、Cd-ITCBE、Cd-ITCBE-OVA 紫外扫描图

Fig.3 UV spectrum of OVA、Cd-ITCBE、Cd-ITCBE-OVA

在图3中, OVA 的吸收峰在 229 nm、283 nm 处, 完全抗原 Cd-ITCBE-OVA 的吸收峰在 228 nm、269 nm 和 279 nm, 三条曲线也几乎不重叠。初步表明人工抗原偶联成功。

2.2 抗血清的测定

第三次免疫后 2 号小鼠的效价和抑制率达到最高, 分别达 1:32000、89%, 进一步说明人工抗原偶联成功。

一般抗血清的效价越高, 其抗体含量越高; 而抑制率则代表小鼠产生的抗体的特异性识别能力, 所以本试验选择效价和抑制率最高的 2 号小鼠血清, 建立重金属镉的 icELISA 检测方法。

2.3 icELISA 检测方法的建立

2.3.1 icELISA 方法优化

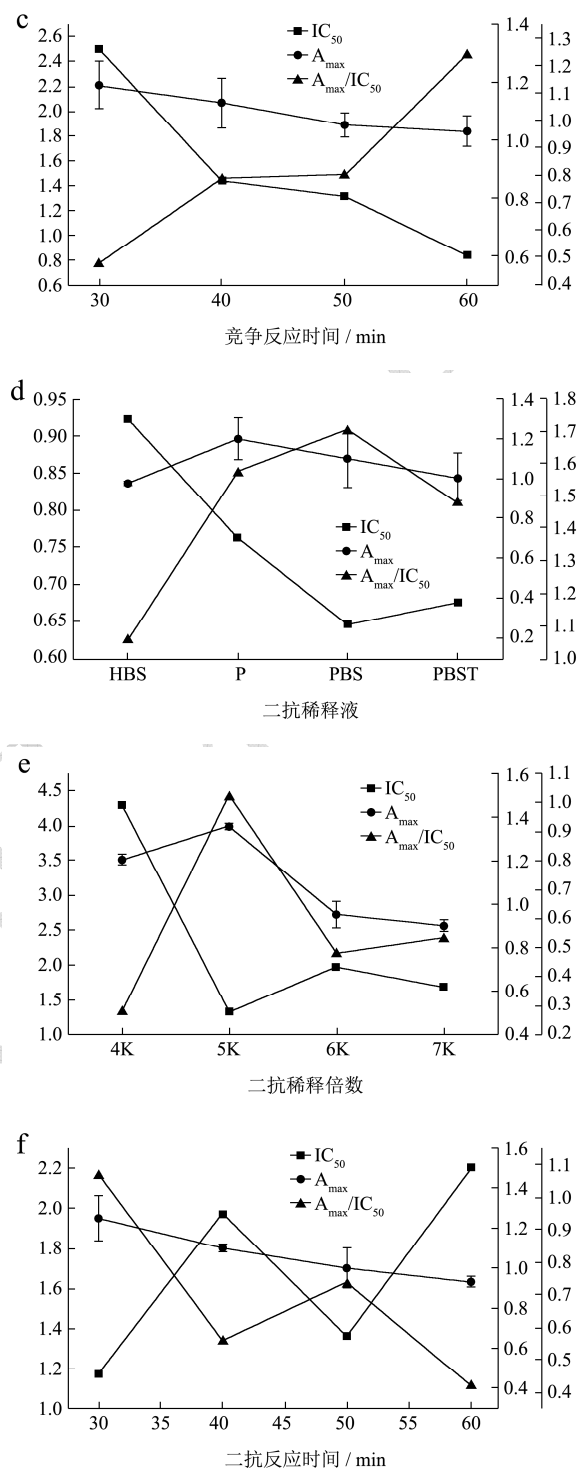
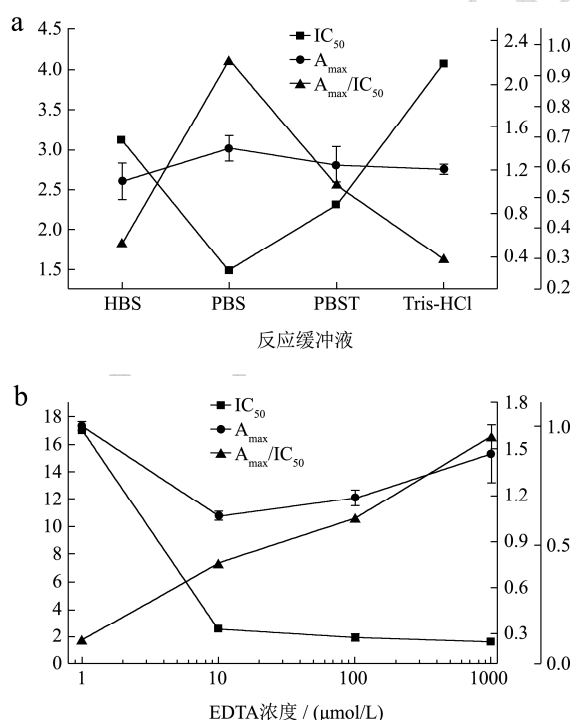


图4 icELISA 反应参数优化结果

Fig.4 Optimization of reaction parameters of icELISA

注: a: 反应缓冲液对标准曲线的影响; b: EDTA 浓度对标准曲线的影响; c: 竞争反应时间对标准曲线的影响; d: 二抗稀释液对标准曲线的影响; e: 二抗稀释倍数对标准曲线的影响; f: 二抗反应时间对标准曲线的影响。

包被原浓度和抗血清稀释倍数组合采用棋盘法确定。包被原稀释倍数由 1 mg/mL 稀释 2000、4000、

8000、16000 倍，浓度依次是 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.125 $\mu\text{g/mL}$ 、0.0625 $\mu\text{g/mL}$ ，抗血清从 1000 倍开始进行倍比稀释。依据吸光值 $A_{450\text{ nm}}$ 范围为 1.0~1.5，初步可选定 4 个包被原浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 与抗体稀释数组合为 0.50/32000、0.25/16000、0.125/10000、0.0625/8000。

将棋盘法选出的 4 种组合分别用 icELISA 方法绘制标准曲线，计算 IC_{50} 值。结果表明，当包被原稀释 4000 倍（浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ ），抗血清稀释 16000 倍时， IC_{50} 最低，因此选用此组合作为后续优化的基础。

依据最大吸光值 (A_{max})、半抑制浓度 (IC_{50}) 和 $A_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 三个指标，确定了其它试验条件（见图 4）：最佳反应缓冲液为 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)，EDTA 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ ，竞争反应时间为 60 min，二抗稀释液为 PBS，二抗稀释倍数为 5000 倍，二抗反应时间为 30 min。

2.3.2 icELISA 标准曲线的建立

以镉离子药物浓度对数为横坐标， B/B_0 值为纵坐标建立镉的 icELISA 标准曲线（图 5）。拟合后计算得到该标准曲线的方程为 $y=0.351+(1.126-0.351)/[1+(x/1.152)^{0.883}]$ ，检测限 (IC_{10}) 为 0.18 ng/mL， IC_{50} 为 1.15 ng/mL，线性检测范围 ($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$) 为

0.24~5.54 ng/mL。

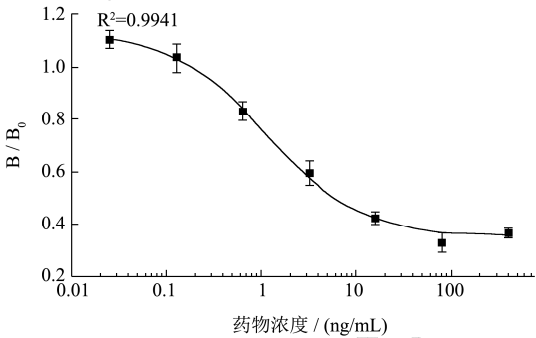


图 5 icELISA 法测镉的标准曲线

Fig.5 Standard curve for the detection of Cd^{2+} by icELISA

2.4 方法特异性评价

选取 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{3+} 和 Cr^{3+} 分别与 EDTA 螯合后采用 icELISA 法测定，考察本方法的特异性，同时为了检验络合剂 EDTA 是否会干扰实验结果，本试验也对 EDTA 进行了 icELISA 测定，计算交叉反应率。结果如表 1 所示，除了与 Hg-EDTA 有 2.16% 的交叉反应率外，该方法对其他测试金属和络合剂 EDTA 的交叉反应率都小于 0.3%。这表明此多抗血清的特异性高，可用于镉离子总量的测定。

表 1 抗血清与镉及其他金属离子-EDTA 螯合物的交叉反应

Table 1 Cross-Reactivity of the antiserum with Cd^{2+} and other metal ions-EDTA conjugates

金属离子-EDTA	$\text{IC}_{50}/(\text{ng/mL})$	交叉反应率/%
Cd-EDTA	1.15	100
Hg-EDTA	53.25	2.16
Pb-EDTA	>2000	<0.3
Fe-EDTA	>2000	<0.3
Cu-EDTA	>2000	<0.3
Cr-EDTA	>2000	<0.3
EDTA	>2000	<0.3

表 2 部分文献报道的重金属镉 ELISA 检测方法参数对比

Table 2 Comparison of parameters of some reported ELISA methods to detect Cd^{2+}

$\text{IC}_{10}/(\text{ng/mL})$	$\text{IC}_{50}/(\text{ng/mL})$	线性范围/(ng/mL)	交叉反应率/%	变异系数/%	参考文献
10.00	250	-	汞离子交叉率 125	-	[36]
-	-	1~1000	汞离子交叉率 3.9	-	[38]
10.00	-	10~640	-	-	[39]
5.00	16.3	-	汞离子交叉率 96.5	12.40	[40]
0.38	418	-	汞离子交叉率 28.3	<10	[41]
260	1150	260~5000	汞离子交叉率 91	-	[16]
14.98	-	10~100000	汞离子交叉率 5.8	-	[42]
15.62	-	125~2000	-	<10	[43]
2.10	19	3.6~98.2	-	-	[7]
0.48	13.67	-	汞离子交叉率 79.29	-	[18]
0.18	1.15	0.24~5.54	汞离子交叉率 2.16	<10	本研究

特异性是衡量抗体质量的标准之一^[16],本研究建立的 icELISA 方法对 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{3+} 和 Cr^{3+} 等 4 种常见金属离子的交叉反应率均小于 0.3%, 仅对 Hg^{2+} 表现出 2.16% 的交叉反应率, 其原因可能为汞和镉与螯合剂螯合后形成的空间构型极为相似造成^[36]。Jones 等^[37]利用距离矩阵法对不同金属螯合物的三维结构进行了比较, 发现 Cd-EDTA 与 Hg-EDTA 的三维结构差异最小, 推测这是产生交叉反应的最主要原因。

与文献报道的重金属镉 ELISA 检测方法相比(表

2), 本研究所建立的 icELISA 方法具有较低的检测限(IC_{10})、 IC_{50} 值和交叉反应率, 本方法的灵敏度和特异性优于表 1 所列文献。

2.5 方法稳定性评价

实验结果如表 3 所示, 板内变异系数总体上比板间变异系数略低, 并且变异系数均低于 10%, 由此证明本研究建立的方法稳定性好, 精密度高。

表 3 板内变异系数和板间变异系数

Table 3 The coefficients of variation in and between plates

板内变异 (n=3)			板间变异 (n=3)		
Cd-EDTA/(ng/mL)	平均抑制率/%	CV/%	Cd-EDTA/(ng/mL)	平均抑制率/%	CV/%
200	78.96±4.75	6.02	200	79.91±6.02	7.53
40	62.14±3.86	6.21	40	63.06±5.27	8.36
8	50.81±3.03	5.96	8	52.72±5.10	9.67
1.6	49.19±3.89	6.78	1.6	49.20±4.68	9.51

3 结论

建立重金属免疫分析法的核心是制备特异性抗体, 而成功制备重金属人工抗原是得到抗体的前提。重金属离子不仅结构简单, 而且分子量小, 不能引起机体的免疫应答反应, 故选择双功能螯合剂络合镉离子, 再与载体蛋白偶联。本研究以双功能螯合剂 ITCBE 螯合 Cd^{2+} , 并偶联载体蛋白 BSA 和 OVA 制备人工完全抗原, 用 Cd-ITCBE-BSA 免疫小鼠制备抗血清, 建立了检测镉的 icELISA 方法, 方法检测限(IC_{10})为 0.18 ng/mL, IC_{50} 为 1.15 ng/mL, 线性范围(IC_{20} ~ IC_{80})为 0.24~5.54 ng/mL。本方法具有良好的特异性, 除了与 Hg^{2+} 有 2.16% 的交叉反应率外, 与 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{3+} 、 Cr^{3+} 的交叉反应率均<0.3%, 板内和板间变异系数均小于 10%。本研究为建立 Cd^{2+} 免疫学快速检测方法和相应试剂盒产品开发奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘艳梅, 钟辉, 向军俭. 重金属免疫学快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 306-311
- [2] Ellis J K, Athersuch T J, Thomas L D, et al. Metabolic profiling detects early effects of environmental and lifestyle exposure to cadmium in a human population [J]. BMC Medicine, 2012, 10(1): 61
- [3] Gawin M, Konefa J, Trzewik B, et al. Preparation of a new

Cd(II)-imprinted polymer and its application to determination of cadmium(II) via flow-injection-flame atomic absorption spectrometry [J]. Talanta, 2010, 80(3): 1310

- [4] 张守申. 二氧化钛纳米与重金属 Cd 离子相互作用降低 Cd^{2+} 对秀丽隐杆线虫的毒性[D]. 济南: 山东大学, 2014
- [5] ZHANG Shou-ren. Absorption on TiO_2 nanoparticles reduced the toxicity of Cd^{2+} to caenorhabditis elegans [D]. Jinan: Shandong University, 2014
- [6] 易宗妮, 何作顺. 镉污染与痛痛病[J]. 职业与健康, 2014, 30(17): 2511
- [7] YI Zong-wei, HE Zuo-shun. Cadmium pollution and itai-itai disease [J]. Occupation and Health 2014, 30(17): 2511
- [8] 王艳. 我国重金属污染事件频发若干问题的思考——以广西龙江镉污染事件为例[J]. 郑州轻工业学院学报(社会科学版), 2014, 6: 36-40
- [9] WANG Yan. Reflections on frequent occurrence of heavy metal pollution events in China—a case study of cadmium pollution events in Longjiang, Guangxi [J]. Journal of Zhengzhou University of Light Industry (Social Science), 2014, 6: 36-40
- [10] 刘艳梅, 钟辉, 黄建芳, 等. 直接竞争 ELISA 检测大米样品中的重金属镉[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(6): 528-532
- [11] LIU Yan-mei, ZHONG Hui, HUANG Jian-fang, et al. Amplification of direct competition ELISA in cadmium ions detection of rice samples [J]. Immunological Journal, 2015, 31(6): 528-532
- [12] Li N, Fang G, Liu B, et al. A novel hydrophobic task specific ionic liquid for the extraction of Cd (II) from water and food

- samples as applied to AAS determination [J]. *Analytical Sciences*, 2010, 26(4): 455-459
- [9] 孙昕炀.中国大米重金属水平分析及其健康风险评估[D]. 南京:南京农业大学,2012
- SUN Xin-yang. Analysis on heavy metal content in rice of china and its health risk evaluation [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2012
- [10] Zhang J, Fang J, Duan X. Determination of cadmium in water samples by fast pyrolysis-chemical vapor generation atomic fluorescence spectrometry [J]. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2016, 122: 52-55
- [11] Ogunfowokan A O, Adekunle A S, Oyeboode B A, et al. Determination of heavy metals in urine of patients and tissue of corpses by atomic absorption spectroscopy [J]. *Chemistry Africa*, 2019, 627(2): 699-712
- [12] 左甜甜,李耀磊,金红宇,等.ICP-MS 法测定 18 种动物药中重金属及有害元素的残留量及初步风险分析[J].*药物分析杂志*,2017,37(2):237-242
- ZUO Tian-tian, LI Yao-lei, JIN Hong-yu, et al. Determination of residues of heavy metals and harmful elements in 18 types of animal medicines by ICP-MS and preliminary risk analysis [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(2): 237-242
- [13] Minkina T M, Soldatoy A V, Nevidomskaya D G, et al. New approaches to studying heavy metals in soils by X-ray absorption spectroscopy (XANES)) and extractive fractionation [J]. *Geochemistry International*, 2016, 54(2): 197-204
- [14] Kovalev I A, Bogacheva L V, Tsysin G I, et al. FIA-FAAS system including on-line solid phase extraction for the determination of palladium, platinum and rhodium in alloys and ores [J]. *Talanta*, 2000, 52(1): 39-50
- [15] Manos M J, Papaefstathiou G S, Pournara A D, et al. A Ca^{2+} MOF combining highly efficient sorption and capability for voltammetric determination of heavy metal ions in aqueous media [J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, 7(25): 15432-15443
- [16] 易翠平,苏芳,陈永发,等.重金属镉单克隆抗体的制备与性质分析[J].*食品科学*,2013,34(21):248-253
- YI Cui-ping, SU Fang, CHEN Yong-fa, et al. Preparation and properties of monoclonal antibody against heavy metal Cd^{2+} [J]. *Food Science*, 2013, 34(21): 248-253
- [17] 俞华齐,王娟,姜忍忍,等.重金属铬单克隆抗体特异性 ELISA 免疫检测方法的建立[J].*江苏农业学报*,2016,32(2): 460-466
- YU Hua-qi, WANG Juan, JIANG ren-ren, et al. Development of specific ELISA for the detection of monoclonal antibody against heavy metal Cr [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(2): 460-466
- [18] 周静清. Cd^{2+} 单克隆抗体的制备及其免疫分析方法的研究[D].太原:山西大学,2016
- ZHOU Jing-qing. Preparation of monoclonal antibodies and research of related immunoassay methods for Cd^{2+} [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016
- [19] He H, Tang B, Sun C, et al. Preparation of hapten-specific monoclonal antibody for cadmium and its ELISA application to aqueous samples [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China*, 2011, 5(3): 409-416
- [20] Darwish I A, Blake D A. One-step competitive immunoassay for cadmium ions: development and validation for environmental water samples [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(8): 1889-1895
- [21] 苏芳,易翠平,付冠艳,等.ELISA 法在检测食品中镉的研究进展[J].*粮食与食品工业*,2013,20(3):65-68
- SU Fang, YI Cui-ping, FU Guan-yan, et al. Advances in ELISA for determination of cadmium in food sample [J]. *Cereal and Food Industry*, 2013, 20(3): 65-68
- [22] Kong T, Liu G W, Li X B, et al. Synthesis and identification of artificial antigens for cadmium and copper [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123(4): 1204-1209
- [23] 姚婵媛,杨金易,徐振林,等.牛奶及水样中泰乐菌素酶联免疫检测方法研究[J].*分析化学*,2018,8:1275-1281
- YAO Chan-yuan, YANG Jin-yi, XU Zhen-lin, et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of tylosin in milk and water samples [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 8: 1275-1281
- [24] 李然,林泽佳,杨金易,等.酶联免疫法检测动物组织及尿液中氟苯尼考与甲砒霉素的残留[J].*分析化学*,2018,8:1321-1328
- LI Ran, LIN Ze-jia, YANG Jin-yi, et al. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for simultaneous detection of florfenicol and thiamphenicol in animal meat and urine [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 8: 1321-1328
- [25] Cui X, Wu P, Lai D, et al. Development of a highly specific fluorescence immunoassay for detection of diisobutyl phthalate in edible oil samples [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(42): 9372-9378
- [26] Shen X, Liu L, Xu L, et al. Rapid detection of praziquantel using monoclonal antibody-based ic-ELISA and

- immunochromatographic strips [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 913-923
- [27] Huo J Q, Bogdan B, Li Z F, et al. Hapten synthesis, antibody development, and a highly sensitive indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of dicamba [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67: 5711-5719
- [28] Lu X, Chen G, Qian Y, et al. Development of a new monoclonal antibody by more active enramycin a and indirect competitive ELISA for the detection of enramycin in edible animal tissues [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(8): 1895-1904
- [29] Cao Y, Shi H, Le T, et al. Development a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening pyrimethanil in fruits and vegetables [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 548-563
- [30] Chen Y S, He Q Y, Shen D, et al. Fluorescence polarization immunoassay based on a new monoclonal antibody for the detection of the diisobutyl phthalate in yoghurt [J]. Food Control, 2019, 105: 38-44
- [31] Zhang W, He L, Zhang R, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of 6-benzylaminopurine and its ribose adduct in bean sprouts [J]. Food Chemistry, 2016, 207: 233-238
- [32] 王津. 重金属镉免疫检测方法的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012
- WANG Jing. Development of immunoassay for the detection of cadmium [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2012
- [33] 沈克强. 诺龙化学发光免疫分析方法的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2014
- SHEN Ke-qiang. Study on chemiluminescent immunosorbent assay for 17 β -19-Nortestosterone [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2014
- [34] 刘涛, 王向红, 常戡, 等. 直接竞争酶联免疫法检测大麦中玉米赤霉烯酮[J]. 食品与机械, 2008, 2: 97-99, 117
- LIU Tao, WANG Xiang-hong, CHANG Yu, et al. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in barley [J]. Food & Machinery, 2008, 2: 97-99, 117
- [35] 王莉. 生物素放大酶联免疫方法检测氯霉素残留[D]. 天津: 天津科技大学, 2010
- WANG Li. Determination of chloramphenicol residues by biotin amplified immunoassay [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2010
- [36] 唐勇, 王建华, 向军俭, 等. 镉离子单克隆抗体的鉴定及竞争 ELISA 的建立[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(2): 214-217, 221
- TANG Yong, WANG Jian-hua, XIANG Jun-jian, et al. Establishment of competitive enzyme-linked immunoassay for cadmium ions detection by using the McAbs against cadmium [J]. Immunological Journal, 2009, 25(2): 214-217, 221
- [37] Jones R M, Yu H, Delehanty J B, et al. Monoclonal antibodies that recognize minimal differences in the three-dimensional structures of metal-chelate complexes [J]. Bioconjugate Chemistry, 2002, 13(3): 408-415
- [38] 鲁亮. 重金属镉人工抗原构建及其多克隆抗体的制备[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011
- LU Liang. Preparation of Cadmium artificial antigen and anti-Cadmium polyclonal antibody [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011
- [39] 郝亚明. 重金属铅、镉单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[D]. 长春: 吉林大学, 2011
- HAO Ya-ming. Preparation of monoclonal antibodies and development of ELISA for lead and cadmium [D]. Changchun: Jilin University, 2011
- [40] 张海棠, 王申锋, 姜金庆, 等. 镉离子单克隆抗体的制备及其阻断 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(2): 208-212
- ZHANG Hai-tang, WANG Shen-feng, JIANG Jin-qing, et al. Preparation of monoclonal antibody and development of blocking ELISA for cadmium ion [J]. China Journal of Biologicals, 2011, 24(2): 208-212
- [41] 王津, 生威, 王俊平, 等. 间接竞争酶联免疫法检测水样中的重金属镉[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 84-86
- WANG Jin, SHENG Wei, WANG Jun-ping, et al. Development of heavy metal cadmium in water samples by competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food & Machinery, 2012, 28(3): 84-86
- [42] 奚涛. 重金属汞、铜、铅、镉的酶联免疫吸附快速检测方法研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015
- XI Tao. Study on enzyme-linked immunosorbent assay of heavy metal mercury, copper, lead and cadmium [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2015