DOI:10.12441/spyswjs.20241202001 [文章编号] 1673-1689(2025)07-0149-12

基于免疫磁珠的喹乙醇磁酶联免疫吸附法的建立与应用

陈子怡[1] 宋妍灵[1] 孙俊杰[1] 李因来[2] 翟 璐[2] 张尧峰[3] 冯俊丽[1] 金仁耀[1*]

(1. 浙江工商大学海洋食品研究院,浙江 杭州 310012; 2. 杭州博岳生物技术有限公司,浙江 杭州 310018; 3. 杭州艾策医疗技术有限公司,浙江 杭州 310018)

摘要:【目的】建立基于免疫磁珠的喹乙醇(olaquindox,OLA)磁酶联免疫吸附法(magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay,MELISA)。【方法】首先合成喹乙醇酶标半抗原(OLA-HS-HRP),并制备免疫磁珠,随后利用偶联完成的免疫磁珠与OLA-HS-HRP,对MELISA的最佳反应条件进行筛选与优化。【结果】免疫磁珠与OLA-HS-HRP的最佳工作稀释倍数分别为100倍和8 000倍,抗体稀释液为含体积分数5%甲醇的PBS缓冲液(0.010 mol/L,pH 7.0);在优化条件下建立的标准方程为y=13.593ln x+17.173(R^2=0.994 3),其中IC_{10}值、IC_{20}值、IC_{50}值、IC_{80}值分别为0.59、1.23、11.19、101.70 ng/mL;该方法的回收率为93.17%~106.83%,变异系数(CV)<7%。【结论】该研究建立的MELISA灵敏度高且结果可靠,不仅为OLA残留检测提供了新方法,也为食品安全领域中其他小分子药物检测提供了理论依据与参考。

关键词:喹乙醇;单克隆抗体;酶标半抗原;免疫磁珠;磁酶联免疫吸附法

Establishment and Application of an Immunomagnetic Bead-based MELISA Method for Olaquindox

CHEN Ziyi[1] *SONG Yanling*[1] *SUN Junjie*[1] *LI Yinlai*[2] *ZHAI Lu*[2] *ZHANG Yaofeng*[3] *FENG Junli*[1] *JIN Renyao*[1*]

(1. Institute of Sea Food, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China; 2. Hangzhou Bioeast Biotech Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 3. Hangzhou Aichek Medical Technology Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to establish a magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) method for olaquindox (OLA) based on immunomagnetic beads. [**Method**] First, olaquindox-hapten conjugated with horseradish peroxidase (OLA-HS-HRP) and immunomagnetic beads were synthesized. Then, the conjugated immunomagnetic beads and OLA-HS-HRP were used to screen and optimize the reaction conditions of MELISA. [**Result**] The optimal working dilution factors for the immunomagnetic beads and OLA-HS-HRP were 100 times and 8 000 times, respectively, with the antibody dilution buffer being PBS solution (0.010 mol/L, pH 7.0) containing methanol at a volume fraction of 5%. Under the optimized conditions, the established standard equation was y=13.593ln x+17.173 (R^2=0.994 3), with IC_{10}, IC_{20}, IC_{50}, and IC_{80} values of 0.59, 1.23, 11.19, and 101.70 ng/mL, respectively. The recovery rate of this method was 93.17%~106.83%, and the coefficient of variation (CV) was <7%. [**Conclusion**] The MELISA established in this study is highly sensitive and reliable, providing a new method for the detection of OLA residues and offering a theoretical basis and reference for the

基金项目:浙江省科技厅公益性研究项目(LGN22C200028)。

通信作者:金仁耀(1981—),男,博士,副研究员,硕士研究生导师,主要从事水产品加工与质量安全快速检测技术研究。E-mail: nodjin@163.com

收稿日期:2024-12-02 **修回日期:**2025-01-14

detection of other small molecule drugs in food safety.

Keywords: olaquindox; monoclonal antibody; enzyme-conjugated hapten; immunomagnetic beads; magnetic bead enzyme-linked immunosorbent assay

OLA是一种兽医专用的非抗生素类抗菌促生长剂[1]，具有明显毒性[2]，可对肝脏、肾脏、心脏等重要脏器造成损害，引发细胞凋亡、组织纤维化等一系列病理变化。若动物长期暴露于低剂量OLA环境中，即使无明显急性中毒症状，也会出现生长迟缓、免疫力下降等亚临床表征，这不仅影响动物养殖效益，更给食品安全带来潜在隐患[3]，进而对人体健康造成威胁。鉴于OLA的潜在危害，建立精准、高效的OLA检测技术十分必要。

目前，OLA最常见的检测方法是高效液相色谱法（HPLC）和酶联免疫吸附法（ELISA）。李瑾瑾等[4]优化并建立了饲料中OLA残留量的HPLC测定方法，该方法的加标回收率为76.1%~97.1%，相对标准偏差为3.78%~7.27%，OLA检测限为0.02 mg/kg，检测效果理想，但存在检测周期长、成本高等缺点。张景艳等[5]针对饲料研发了间接竞争酶联免疫吸附测定（ic-ELISA）试剂盒，检测限为0.79 μg/L，方法灵敏度较低；此外，ELISA法对试剂储存条件、检测人员操作技能要求较高，且易发生交叉污染，难以满足市场监管中“实时、快速、现场检测”的需求。这些传统检测方法往往受限于灵敏度低，无法有效检测出生物样本及饲料中微量OLA残留，导致其隐匿性危害难以被及时发现。另外，复杂样本基质中的干扰成分极易影响检测准确性，从而大幅降低检测结果的可靠性。而当前养殖环境与食品供应链的复杂性，又对OLA残留检测技术提出了“快速、便于现场检测”的要求，以满足实时监控需求。

在糠氨酸检测领域，传统检测手段也面临类似困境，杨敏仪等[6]通过建立基于多克隆抗体的ic-ELISA方法，在一定程度上克服了传统方法的不足，为食品中糠氨酸的高效检测提供了新选择。该研究正是基于这一背景，致力于探索一种灵敏度更高、稳定性更好的OLA检测方法，而免疫磁珠技术所展现的独特优势为此提供了方向。免疫磁珠技术不仅具备固相化试剂稳定性好的优点，还拥有免疫学反应的高度专一性[7]，广泛应用于生物分离、免疫测定等多个领域[8]。MELISA是将免疫磁珠技术与免疫分析技术相结合，以磁珠作为固相载体，在保持目标物本身活性的基础上，利用磁珠较大的比表面积提升富集分离效率[9]。该方法有望打破传统检测的瓶颈，显著提升OLA残留检测的灵敏度与稳定性。在此基础上，该研究的核心问题聚焦于磁珠与抗体偶联环节。

作者首先用1-乙基-（3-二甲基氨基丙基）碳酰二亚胺（EDC）与*N*-羟基丁二酰亚胺（NHS）活化磁珠，再与喹乙醇单克隆抗体（OLA-mAb）偶联，制备得到偶联了OLA-mAb的免疫磁珠（OLA-mAb-Mag）。基于免疫磁珠在液体中富集分离目标物时抗原和抗体会进行充分反应的特性，通过优化OLA-mAb与磁珠的偶联条件及免疫磁珠的反应条件，建立检测OLA残留的MELISA方法。该方法利用磁珠免疫技术结合优化后的反应体系，实现对OLA的高特异性捕获与信号放大，旨在为OLA残留检测提供兼具超高灵敏度、稳定性与操作便捷性的技术手段，为食品安全防线提供支撑。

1 材料与方法

1.1 试剂

OLA、青霉素、四环素、氯霉素、卡巴氧、莱克多巴胺、羊抗鼠酶标二抗（IgG-HRP）、牛血清蛋白质（BSA）、异硫氰基荧光素（FITC）：美国Merck公司；喹乙醇半抗原（OLA-HS）、喹乙醇人工抗原（OLA-HS-OVA）、OLA-mAb：作者所在实验室自制；三羟甲基氨基甲烷（Tris）：生工生物工程（上海）股份有限公司；乙二胺四乙酸二钠（EDTA-2Na）、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钾、磷酸二氢钾：分析纯，国药集团化学试剂有限公司；免疫磁珠：杭州博岳生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

酶标仪：IMARK型，美国Bio-Rad公司；电子天平：BSA124S-CW型，德国Sartorius公司；纯水仪：Milli-Q® Reference型，美国Merck公司；移液枪：Research® plus系列，德国Eppendorf公司；自动洗板机：Aquamax® mi-croplate Washers型，美国Molecular Devices公司；恒温恒湿培养箱：

LHS-150SC型，上海一恒科学仪器有限公司；振荡器：HZQ-300A型，北京海淀电子医疗仪器厂；荧光显微镜：Ti-U型，日本NIKON公司。

1.3 OLA-HS-HRP的制备

参照Kong等[10]的方法并稍加改进。将0.20 mmol OLA-HS、0.25 mmol二环己基碳二亚胺和0.25 mmol NHS溶于1 mL *N*,*N*-二甲基甲酰胺中，于室温下搅拌过夜。随后以4 000 r/min离心10 min，取上清液缓慢滴加到6 mL含有120 mg辣根过氧化物酶（HRP）的碳酸盐缓冲液（CBS）中，避光搅拌4 h。在PBS中透析3 d，期间定期更换透析液，此步骤与王何瑶等[11]对蛋白质纯化后的透析方法类似，旨在去除杂质，保证后续检测的准确性。透析完成后，吸取透析袋内的抗原，离心处理后分装，于−20 ℃冻存备用。采用紫外扫描曲线和郭尧君[12]介绍的SDS-PAGE法验证偶联是否成功。SDS-PAGE操作参数为：浓缩胶为5 g/dL，分离胶为10 g/dL；浓缩胶电压80 V，分离胶电压120 V；考马斯亮蓝染色30 min，脱色液脱色2~3次，直至各蛋白质条带清晰，最后拍照并进行条带分析。

1.4 免疫磁珠的制备和偶联条件的优化

吸取适量超声后的磁珠悬浮液于孔板，每孔加入500 μL 0.01 mol/L的PBST洗涤3次。每孔加入100 μL新鲜配制的EDC（10 mg/mL）和NHS（10 mg/mL），于室温振荡活化30 min，活化完成后进行磁分离，去除上清液。随后加入PBST重新洗涤2次，去除上清液。将活化后的磁珠与300 μL OLA-mAb混合，于室温下振荡反应，期间保持磁珠悬浮。经不同反应时间（30、60、90、120 min）后，分别收集上清液与第一次清洗液的上清液，采用BCA试剂盒测定上清液中的抗体质量浓度，计算偶联率并确定最佳偶联时间。在确定最佳反应时间后，按上述方法，改变OLA-mAb的添加量（5、10、15、20、25 μg），通过测定不同抗体添加量下的偶联率，确定OLA-mAb的最佳添加量。其中偶联率按式（1）计算。

$$\gamma=\frac{\theta_0-\theta_1}{\theta_0}\times 100\% \quad (1)$$

式中：

γ——偶联率，%；

θ_0——抗体添加量，μg；

θ_1——流穿液抗体剩余量，μg。

1.5 磁珠粒径的选择

分别取粒径为1 000、2 000、2 800 nm的磁珠与OLA-mAb振荡偶联，用PBST洗涤3次，然后加入IgG-HRP继续振荡反应1 h。反应结束后，再次用PBST洗涤3次，加入TMB显色液，于37 ℃恒温恒湿箱中放置15 min进行显色反应，然后用终止液终止反应。最后进行磁分离，吸取上清液，测定其在450 nm下的吸光度（OD_{450}值）。

1.6 FITC染色用量的选择

磁珠与抗体偶联完成后，用PBST洗涤2次，加入质量分数1%的BSA（含有体积分数0.05%的Tween-20），封闭反应30 min，再次用PBST洗涤。取FITC溶于CBS中制成FITC溶液，将溶液与磁珠混合，避光标记30 min。标记反应结束后，将磁珠样品置于荧光显微镜下观察。按上述操作，用CBS将FITC分别按1∶100和1∶200的比例稀释后进行试验，通过荧光显微镜观察结果，选择荧光清晰明亮的一组作为最适稀释倍数[13]。

1.7 免疫磁珠的稳定性

取200 μL的0.1 mol/L的NaCl溶液，对偶联完成后的磁珠进行洗涤，分别洗脱3次、5次和7次。收集各洗脱条件对应的上清液，用BCA试剂盒测定上清液的蛋白质质量浓度，进而计算偶联OLA-mAb后磁珠的稳定性[14]。稳定性计算方法见式（2）。

$$\delta=\frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

δ——免疫磁珠的稳定性，%；

ε_1——洗脱后免疫磁珠上偶联的抗体量，μg；

ε_2——洗脱前免疫磁珠上偶联的抗体量，μg。

1.8 免疫磁珠与OLA-HS-HRP最佳工作稀释倍数的优化

采用棋盘滴定法进行试验[15]，用质量分数5%的脱脂牛奶包板30 min，用PBS缓冲液依次将OLA-mAb-Mag稀释至60倍、80倍、100倍、120倍和140倍，按纵向加入包被酶标板中，100 μL/孔。将酶标板置于磁力架上，移除上清液。加入OLA标样，50 μL/孔，将OLA-HS-HRP用抗体稀释液分别稀释4 000倍、8 000倍、16 000倍和32 000倍，按横向加入包被酶标板中，50 μL/孔。将酶标板置于

37 ℃恒温恒湿箱中孵育 1 h，随后用 PBST 洗涤 2 次，再加入 300 μL PBST 浸泡 3 min。滴入 100 μL TMB 显色液，孵育 15 min，然后滴入 50 μL 终止液终止显色。利用酶标仪测定 OD_{450} 值，选取 OD_{450} 值为 1.0 时对应的稀释倍数作为最佳工作稀释倍数。

1.9 抗体稀释缓冲液选择

分别配制 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200 mol/L 的 pH 7.4 的 PBS 缓冲液和 pH 8.8 的 Tris-HCl 缓冲液。每个浓度设 3 组平行，根据各浓度下对应的各项检测指标进行分析，建立线性回归方程，并计算相应的 IC_{20} 值、IC_{50} 值和 IC_{80} 值，确定抗体稀释缓冲液的最佳浓度及种类。在此基础上，配制不同 pH（6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）的抗体稀释缓冲液，每个 pH 下设 3 组平行，确定抗体稀释缓冲液的最佳 pH。

1.10 配制 OLA 标准溶液的有机溶剂选择

采用上述优化的条件进行该试验。以甲醇和乙腈作为有机溶剂，分别设置 5%、10%、20% 和 40% 的添加体积分数，配制对应体积分数的有机标准溶液；随后对初始质量浓度为 1 000 ng/mL 的 OLA 标准溶液进行梯度稀释（采用 2.5 倍稀释法，共设 11 个质量浓度梯度，同时设置对照组），并将稀释后的 OLA 标准溶液与 OLA-HS-HRP 溶液反应。根据试验结果建立线性回归方程，计算 IC_{20} 值、IC_{50} 值和 IC_{80} 值，确定最佳有机溶剂。

1.11 标准曲线的绘制与拟合

按照上述方法筛选的最优条件建立 MELISA。设置 OLA 标准溶液的质量浓度梯度和对照组，向每孔中先后加入 50 μL OLA 标准溶液和 50 μL OLA-HS-HRP 溶液，振荡反应后加入 TMB 显色液，待显色完成后用终止液终止反应。吸取上清液，使用酶标仪测定 OD_{450} 值，根据 OD_{450} 值建立标准曲线。

1.12 特异性试验

为测定该方法的交叉反应率，选取 OLA 的结构类似物（青霉素、四环素、氯霉素、卡巴氧和莱克多巴胺）进行研究。将 OLA 及其结构类似物分别配制成 1、2、4、8、16、100、500 ng/mL 的溶液，采用已建立的 MELISA 方法对各溶液进行检测，计算各自的 IC_{50} 值[16]，进而计算交叉反应率。交叉反应率计算方法见式（3）。

$$Y=\frac{C_1}{C_2}\times 100\% \quad (3)$$

Y——交叉反应率，%；

C_1——OLA 的 IC_{50} 值；

C_2——OLA 结构类似物的 IC_{50} 值。

1.13 OLA 添加回收率试验

参照 GB/T 8381.7—2009《饲料中喹乙醇的测定 高效液相色谱法》进行。分别配制 5、10、20、50、100 ng/g 的 OLA 标准溶液备用，对饲料、池塘水、自来水 3 类样品进行处理和添加回收率试验。各样品处理操作分别为：将鱼饲料样品研磨粉碎，通过 60 目筛筛选后准确称取 1 g 放入离心管中；对浙江工商大学附近的池塘水样品进行过滤，取 1 mL 滤液加入离心管；移取 1 mL 作者所在实验室的自来水样品至离心管中。向各离心管中的样品分别添加不同质量浓度或质量分数的 OLA 标准溶液。后续处理中，饲料样品室温静置 1 h 后，加入 3 mL 含甲醇体积分数 5% 的最佳有机溶液，振荡 1 min，于 4 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液后再于 10 000 r/min 离心 10 min，吸取上清液检测；池塘水样品加入 2 mL 含甲醇体积分数 5% 的最佳有机溶液，自来水样品加入 1 mL 含甲醇体积分数 5% 的最佳有机溶剂，直接混匀后检测。计算 3 种样品的添加回收率、检测值和 CV。

1.14 HPLC 验证

用甲醇配制 OLA 标准溶液母液，将其储备于棕色容量瓶中，置于冰箱保存。随后用体积分数 5% 的甲醇溶液对母液进行梯度稀释，得到质量浓度分别为 5、10、20、50、100 μg/mL 的标准溶液。流量为 1.00 mL/min，进样量为 10~20 μL。流动相 A 为超纯水，流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序为：0~5 min 时，流动相 B 体积分数为 15%；5~10 min 时，流动相 B 体积分数为 15%~70%；10~14 min 时，流动相 B 体积分数为 70%；14~18 min 时，流动相 B 体积分数为 70%~15%；18~25 min 时，流动相 B 体积分数为 15%。在饲料样品的 HPLC 添加回收率测定中，称取 1 g 经研磨后过 60 目筛的饲料样品，添加 OLA 标准液及含体积分数 5% 甲醇的 PBS 溶液，使样品中标准样品的质量分数分别为 6、10、20 μg/g。避光振荡 45 min，取上清液于 12 000 r/min 离心 10 min，重复离心 1 次，取上清液过滤膜后上机测定。对 3 种质量分数的饲料上清液进行

稀释，调整质量分数分别为6、10、20 ng/g，采用MELISA检测并分析数据，通过与HPLC检测结果比对，验证该分析方法的可行性。

1.15　数据处理

所有试验在相同条件下重复测定3次，结果以均值±标准差的方式表示。采用Excel 2019进行数据分析处理，采用Origin 2019软件作图。

2　结果与讨论

2.1　OLA-HS-HRP的表征

采用紫外扫描仪测定OLA-HS、OLA-HS-HRP、HRP的紫外吸收光谱，见图1。HRP的最大吸收峰位于410 nm，而OLA-HS-HRP的紫外吸收曲线较OLA-HS和HRP发生了偏移，其最大吸收峰位于400 nm。这表明在OLA-HS-HRP的形成过程中，分子轨道发生了重排，电子云分布改变，致使吸收光子的能量需求产生变化[17]。此外，OLA-HS-HRP与OLA-HS和HRP的波形发生了改变，初步表明OLA-HS-HRP偶联成功，最大吸收峰的偏移和波形变化是由新形成的偶联物所致[18]。OLA-HS-HRP的SDS-PAGE结果见图2。OLA-HS-HRP的电泳条带相较于HRP出现滞后和拖尾现象，这是由于HRP偶联了部分半抗原后，偶联物的相对分子质量大于载体HRP的相对分子质量。在电场作用下，相对分子质量较大的物质，迁移速率较慢，且由于偶联物分子结构的不规则性增加，相较于单一HRP分子更易受到凝胶介质的阻滞，因此在电泳过程中呈现出滞后和拖尾的现象[19]。结合紫外吸收光谱结果，可证明OLA-HS-HRP偶联成功。

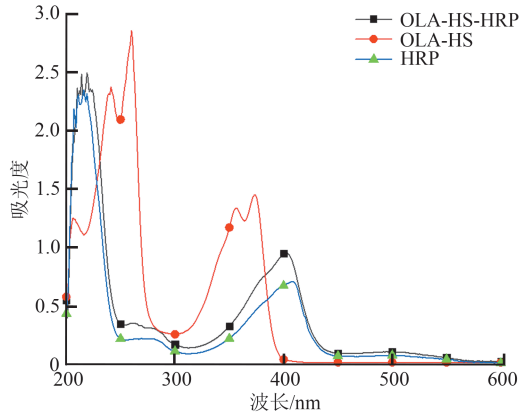


图1　3种物质的紫外吸收光谱

Fig. 1　UV spectra of three substances

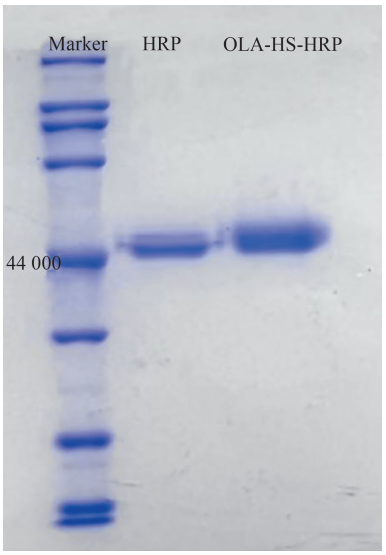


图2　OLA-HS-HRP和HRP的SDS-PAGE结果

Fig. 2　SDS-PAGE results of OLA-HS-HRP and HRP

2.2　偶联条件的优化结果

随着偶联时间的延长，偶联率呈先升高后降低的趋势，在偶联时间为90 min时偶联率达到最高，为89.09%，见图3(a)。结果表明，90 min时结合到磁珠上的抗体量已达到饱和，即使进一步延长偶联时间，偶联率也不再上升。因此，选择90 min作为磁珠与抗体的最佳偶联时间。

随着抗体(OLA-mAb)添加量的增加，偶联率同样呈先升高后降低的趋势，在添加量为20 μg时偶联率达到峰值，说明此时结合到磁珠上的抗体量达到饱和，见图3(b)。当抗体添加量超过20 μg时，偶联率开始下降，可能是由于磁珠表面的活性基团数量有限，当抗体添加至一定数量后，磁珠表面可偶联的数量已达到最大值[20]。但由于抗体添加量在20 μg与15 μg时对应的偶联率相差较小，综合考虑试验效果与材料成本，选择15 μg作为抗体的最佳添加量。

2.3　磁珠粒径的确定

分别取粒径为1 000、2 000、2 800 nm的磁珠与OLA-mAb振荡偶联，测定得到不同粒径磁珠对应的偶联物的吸光度分别为1.01±0.02、1.07±0.05、2.00±0.03。2 800 nm粒径磁珠吸光度最高，由于吸光度与蛋白质质量浓度呈正相关，可用吸光度表征抗体质量浓度[21]，说明2 800 nm磁珠偶联的抗体最多，效果最好。磁珠粒径越大，其磁响应性往往越强，在施加外部磁场时，更容易被吸引和分

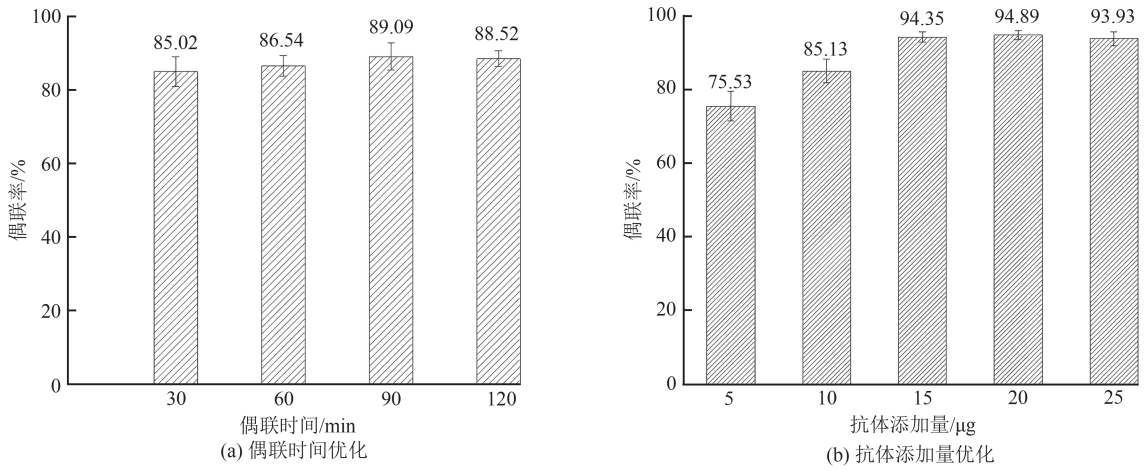


图 3　磁珠与抗体的偶联条件优化结果

Fig. 3　Optimized conjugation conditions for magnetic beads and antibodies

离[22]。为使后续磁分离操作更迅速、高效，选择粒径为 2 800 nm 的磁珠作为后续反应的基础。

2.4　FITC 染色用量的确定

未偶联 OLA-mAb 的磁珠，即使被 FITC 染色，在荧光下依旧不见绿光，表明 FITC 染色也可用于鉴别 OLA-mAb 和磁珠是否偶联成功。由图 4 可知，FITC 在 1∶200 稀释比例下的免疫磁珠的荧光清晰明亮，因此最终选择 FITC 的稀释比例为 1∶200。

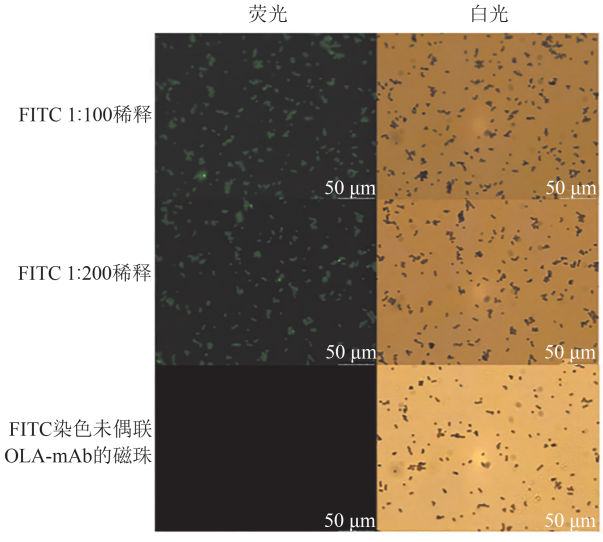


图 4　FITC 标记的 OLA-mAb-Mag 最适染色用量

Fig. 4　Optimal staining dosage of FITC-labelled OLA-mAb-Mag

2.5　免疫磁珠的稳定性结果

不同洗涤次数下 OLA-mAb-Mag 的稳定性结果见表 1。可以看到，随着洗涤次数的增加，OLA-mAb-Mag 的稳定性逐渐降低。在磁珠洗脱过程中，由于抗体与磁珠表面的结合作用力存在差异，那些通过氢键、范德华力等较弱非共价键相互结合的松散抗体，会在洗脱液作用下被优先去除[23]。洗涤次数越多，磁珠表面保留的抗体越少，导致磁珠免疫活性降低，宏观上表现为磁珠稳定性降低[24]。为确保 OLA-mAb-Mag 在后续试验中具有良好效果，确定该磁珠的最大洗涤次数（即重复利用次数）为 3 次。

表 1　不同洗涤次数下 OLA-mAb-Mag 的稳定性

Table 1　Stability of OLA-mAb-Mag under different washing times

洗涤次数/次	稳定性/%
3	95.78
5	88.49
7	72.35

2.6　免疫磁珠与 OLA-HS-HRP 工作稀释倍数的确定

当 OLA-mAb-Mag 稀释倍数固定时，随着 OLA-HS-HRP 稀释倍数的增加，体系吸光度呈逐渐减小趋势，见表 2。这是因为随着 OLA-HS-HRP 稀释倍数的增加，单位体积内可与 OLA-mAb-Mag 表面抗体特异性结合的抗原数量相对减少，两者有效碰撞几率降低，导致免疫复合物形成速率减缓，最终在宏观上表现为吸光度衰减。当 OLA-HS-HRP 稀释倍数固定时，随着 OLA-mAb-Mag 稀释倍数的增加，磁珠表面可参与反应的抗体数量减少，与抗原结合的位点随之减少，同样会阻碍免疫复合物生成，使得吸光度逐渐下降。此外，在 ELISA 相关技术领域，通常以吸光度接近 1 为参

考标准，吸光度超过1会偏离线性范围。当OLA-mAb-Mag和OLA-HS-HRP稀释倍数分别为100倍和8 000倍时，吸光度接近1，因此确定该稀释倍数组合为两者的最佳稀释倍数。

表2　OLA-mAb-Mag与OLA-HS-HRP最佳稀释倍数的确定

Table 2　Optimization of the optimal dilution factors of OLA-mAb-Mag and OLA-HS-HRP

OLA-HS-HRP稀释倍数/倍	吸光度				
	OLA-mAb-Mag稀释60倍	OLA-mAb-Mag稀释80倍	OLA-mAb-Mag稀释100倍	OLA-mAb-Mag稀释120倍	OLA-mAb-Mag稀释140倍
4 000	3.69±0.05	3.32±0.04	2.07±0.05	1.98±0.04	1.30±0.02
8 000	3.64±0.02	2.61±0.01	1.04±0.02	0.85±0.05	0.82±0.03
16 000	3.59±0.03	1.92±0.02	0.70±0.01	0.45±0.03	0.42±0.05
32 000	3.52±0.02	1.14±0.06	0.28±0.03	0.27±0.05	0.22±0.02

2.7　最佳抗体稀释缓冲液的确定

不同缓冲液稀释抗体后，OLA抑制率结果见图5。其中0.200、0.010 mol/L的PBS缓冲液稀释样品的IC_{50}值接近且较低，表明在此条件下抗体展现出较高的检测灵敏度。较高灵敏度意味着在检测OLA等目标物质时，仅需较低质量浓度就能使抗体与抗原的结合反应受到50%抑制，这对捕捉样本中微量目标物极为有利，既能精准察觉低质量浓度目标物变化引发的反应抑制变化，又能显著提升检测敏锐度。同时，稳定且重复性较好的IC_{50}值是保障检测准确性的关键，可有效避免不同批次试验或样本间因IC_{50}值波动造成的定量误差，确保对目标物质量浓度进行准确判断。由表3可以看出，0.200 mol/L PBS缓冲液对应的线性回归方程斜率过大，这会导致最终OLA质量浓度测定范围变窄。斜率表征反应信号强度随抑制剂质量浓度的变化速率：斜率过大时，抑制剂质量浓度稍有波动，反应信号强度便会急剧改变，使得在较小的质量浓度变化区间内，信号强度会轻易触及检测仪器的极限值，无法再精准测量更高或更低质量浓度的抑制剂，严重压缩了可准确检测的线性范围；反之，若斜率过小，虽可以拓宽检测范围，但会降低检测分辨率，使不同质量浓度抑制剂间的信号差异难以辨别，影响定量分析的精度。综合考虑，0.010 mol/L pH 7.4的PBS缓冲液的表现更优。0.050 mol/L pH 8.8的Tris-HCl缓冲液相较于其他组而言，IC_{50}值较低且曲线的斜率也较为合适，见图5(b)和表4。但对比发现，0.010 mol/L PBS缓冲液的IC_{20}值、IC_{50}值、IC_{80}值均低于0.050 mol/L的Tris-HCl缓冲液。pH 7.0的PBS缓冲液的IC_{20}值、IC_{50}值、IC_{80}值低于其他组，见图6和表5。这表明用0.010 mol/L pH 7.0的PBS缓冲液稀释的抗体，其检测灵敏度更高。综上所述，该研究最终选择0.010 mol/L pH 7.0的PBS缓冲液作为抗体稀释缓冲液。

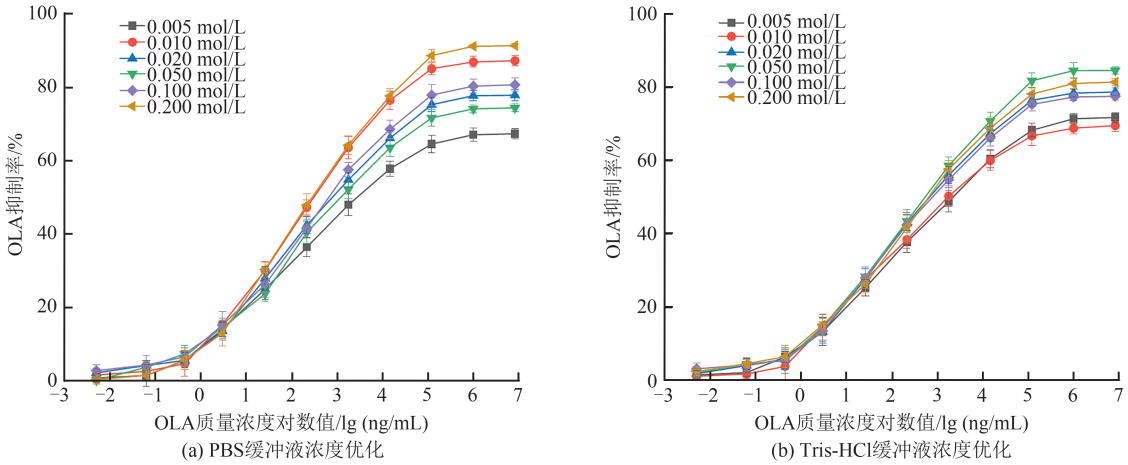


图5　不同抗体缓冲液下的OLA抑制曲线

Fig. 5　OLA inhibition curves in different buffer solutions

表 3　不同浓度 PBS 缓冲液稀释抗体的 MELISA 结果

Table 3　MELISA results for antibodies diluted with PBS solutions at different concentrations

PBS 缓冲液浓度/(mol/L)	线性方程	R^2	IC_{20} 值/(ng/mL)	IC_{50} 值/(ng/mL)	IC_{80} 值/(ng/mL)
0.200	y=16.175ln x+9.224 7	0.993 7	1.95	12.44	79.49
0.100	y=13.813ln x+9.900 4	0.993 7	2.08	18.23	159.96
0.050	y=12.534ln x+9.994 7	0.991 7	2.22	24.33	266.46
0.020	y=13.385ln x+9.742 8	0.995 6	2.15	20.24	190.37
0.010	y=15.554ln x+9.991 0	0.993 7	1.90	13.10	90.11
0.005	y=11.266ln x+9.804 9	0.996 1	2.47	35.44	508.11

表 4　不同浓度 Tris-HCl 缓冲液稀释抗体的 MELISA 结果

Table 4　MELISA results for antibodies diluted with Tris-HCl solutions at different concentrations

Tris-HCl 缓冲液浓度/(mol/L)	线性方程	R^2	IC_{20} 值/(ng/mL)	IC_{50} 值/(ng/mL)	IC_{80} 值/(ng/mL)
0.200	y=13.849ln x+9.975 6	0.993 9	2.06	17.99	157.00
0.100	y=13.367ln x+9.890 5	0.995 7	2.13	20.10	189.61
0.050	y=14.542ln x+9.611 9	0.997 3	2.04	16.08	126.51
0.020	y=13.641ln x+9.790 2	0.994 6	2.11	19.06	171.84
0.010	y=11.833ln x+9.987 4	0.993 5	2.33	29.41	371.19
0.005	y=11.877ln x+9.733 5	0.996 7	2.37	29.67	370.99

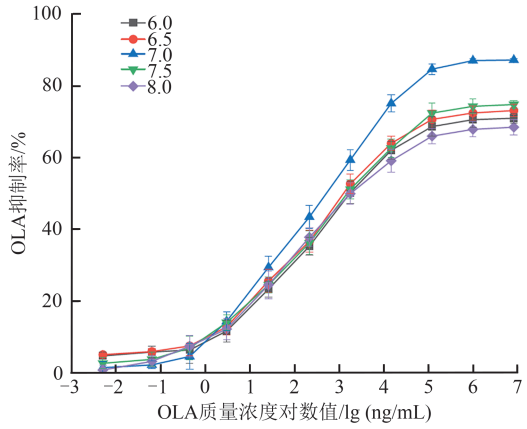


图 6　不同 pH 下的 OLA 抑制曲线

Fig. 6　OLA inhibition curves under different pH values

2.8　配制 OLA 标准溶液的有机溶剂确定

体积分数 5% 的甲醇组 IC_{50} 值最低，且对应的线性回归方程斜率也较适宜，见图 7(a)和表 6。体积分数 20% 的乙腈组同样表现出较低的 IC_{50} 值，斜率也符合试验要求，见图 7(b)和表 7。对比上述 2 组有机溶液中的最优组，发现体积分数 5% 的甲醇组与体积分数 20% 的乙腈组线性回归方程斜率接近，但前者的 IC_{20} 值、IC_{50} 值、IC_{80} 值均低于体积分数 20% 的乙腈组。这表明体积分数 5% 的甲醇组中抗体的灵敏度更高，这可能与甲醇极性较强、更易挥发的特性有关。因此，选择体积分数 5% 的甲醇作为配制 OLA 标准溶液的有机溶剂。

表 5　不同 pH 的 PBS 抗体稀释液的 MELISA 结果

Table 5　MELISA results of antibodies diluted with PBS solutions at different pH values

pH	线性方程	R^2	IC_{20} 值/(ng/mL)	IC_{50} 值/(ng/mL)	IC_{80} 值/(ng/mL)
6.0	y=12.318ln x+8.267 1	0.990 3	2.41	22.96	218.36
6.5	y=12.489ln x+9.632 0	0.990 0	2.29	25.34	279.89
7.0	y=15.337ln x+8.828 0	0.996 9	2.07	14.65	103.60
7.5	y=12.545ln x+9.197 9	0.994 8	2.37	25.85	282.55
8.0	y=11.551ln x+9.968 3	0.990 2	2.38	32.00	429.59

2.9　标准曲线结果

按照上述最优条件建立 MELISA，其线性回归方程为 y=13.593ln x+17.173(R^2=0.994 3)，见图 8。进一步计算得到其 IC_{10} 值为 0.59 ng/mL，IC_{50} 值为 11.19 ng/mL。与抗原包被和抗体包被的 ELISA 相比，该研究建立的 MELISA 检测限更低，灵敏度更高；相对标准偏差为 0.46~2.72，说明该 MELISA 方法具有较好的稳定性。

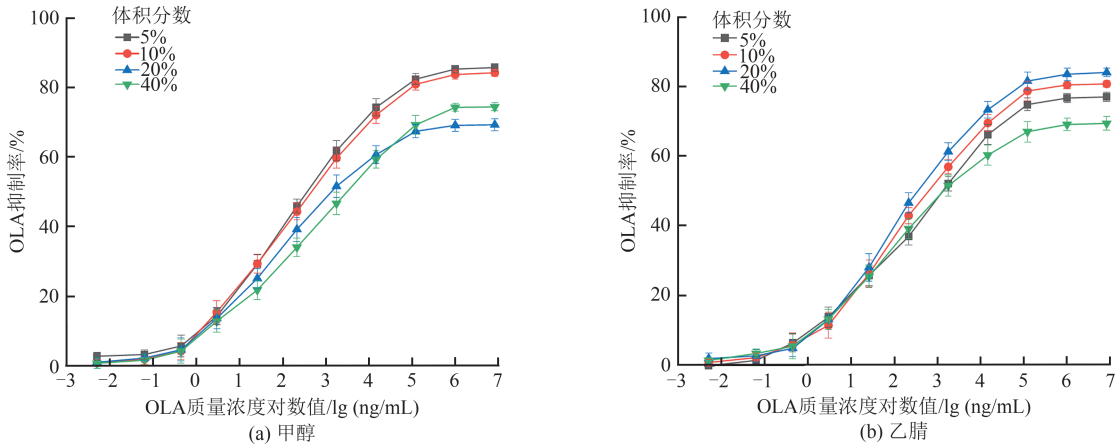


图 7　不同有机溶剂下的 OLA 抑制曲线

Fig. 7　OLA inhibition curves under different organic solvents

表 6　不同体积分数甲醇配制 OLA 标准溶液的 MELISA 结果

Table 6　MELISA results of OLA standard solutions prepared with different volume fractions of methanol

甲醇体积分数/%	线性方程	R^2	IC_{20}值/(ng/mL)	IC_{50}值/(ng/mL)	IC_{80}值/(ng/mL)
5	y=14.992ln x+9.935 3	0.992 2	1.96	14.47	107.07
10	y=14.627ln x+9.710 6	0.995 9	2.02	15.71	122.18
20	y=12.093ln x+9.381 4	0.991 8	2.41	28.76	343.65
40	y=12.25ln x+6.981 7	0.996 4	2.89	33.51	387.87

表 7　不同体积分数乙腈配制 OLA 标准溶液的 MELISA 结果

Table 7　MELISA results of OLA standard solutions prepared with different volume fractions of acetonitrile

乙腈体积分数/%	线性方程	R^2	IC_{20}值/(ng/mL)	IC_{50}值/(ng/mL)	IC_{80}值/(ng/mL)
5	y=13.185ln x+9.006 2	0.994 3	2.30	22.40	217.99
10	y=14.313ln x+8.615 1	0.991 8	2.22	18.02	146.56
20	y=15.03ln x+9.383 9	0.990 3	2.03	14.91	109.77
40	y=11.942ln x+9.926 2	0.991 1	2.32	28.67	353.49

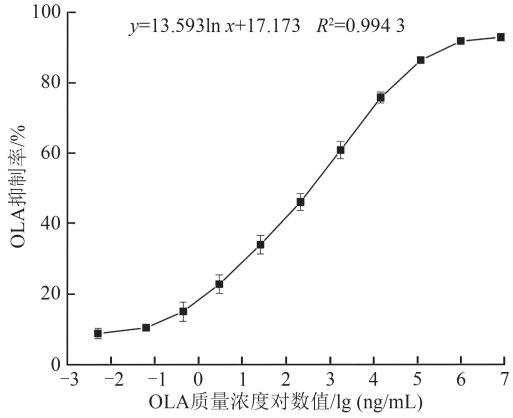


图 8　MELISA 测定的 OLA 抑制曲线

Fig. 8　OLA inhibition curve measured by MELISA

2.10　特异性结果

使用 MELISA 测定 OLA 及其结构类似物的交叉反应率，见表 8。可以看出，免疫磁珠对青霉素、四环素、氯霉素、卡巴氧和莱克多巴胺的交叉反应率均较低，而在相同条件下对目标物（OLA）的捕获率较高。这表明 OLA-mAb 与其结构类似物无任何交叉反应，证明该抗体具有很强的特异性，能够满足检测需求。

表 8　OLA 及其结构类似物的交叉反应率

Table 8　Cross-reactivity rates of OLA with its structural analogues

化合物	IC_{50}值/(ng/mL)	交叉反应率/%
OLA	11.19	100.00
青霉素	>4 000.00	<0.28
四环素	>4 000.00	<0.28
氯霉素	>4 000.00	<0.28
卡巴氧	>4 000.00	<0.28
莱克多巴胺	>4 000.00	<0.28

2.11 OLA添加回收率试验结果

采用MELISA对饲料中的OLA进行检测，结果见表9。该方法展现出良好的检测效果，且结果较稳定，CV均在6%以下，低CV表明在多次重复检测过程中，所得结果的离散程度极小，检测重复性较好。对池塘水开展添加回收率试验，结果见表10。在低添加质量浓度下，CV较高，这可能是由于低质量浓度下本底值干扰所致；在池塘水中该方法的回收率为93.17%～106.83%，且CV均小于7%。回收率反映检测方法对目标物质的回收能力，接近100%的回收率说明该方法能从成分复杂的池塘水样本中较准确地捕获OLA，具备良好的抗干扰能力。对自来水进行相关回收率试验，结果见表11。由于自来水成分相对单一，在此情况下CV均在6%以下，这意味着无论是初次检测还是后续重复检测，针对自来水中可能存在的微量OLA，该方法均能给出一致性良好的检测结果。综上，MELISA具有灵敏度高、稳定性强的特点，可满足不同类型样本的检测要求，充分凸显出该方法在不同样本类型下的稳定应用优势。

表9 MELISA对饲料中OLA添加回收率检测结果

Table 9 Spiked recovery rate of OLA in feed determined by MELISA

添加质量分数/（ng/g）	检测值/（ng/g）	回收率/%	CV/%
5	5.67±0.29	94.93~105.07	5.07
10	9.29±0.21	97.69~102.31	2.31
20	20.22±0.58	97.14~102.86	2.86
50	50.63±2.08	95.88~104.12	4.12
100	101.37±2.88	97.16~102.84	2.84

表10 MELISA对池塘水中OLA添加回收率检测结果

Table 10 Spiked recovery rate of OLA in pond water determined by MELISA

添加质量浓度/（ng/mL）	检测值/（ng/mL）	回收率/%	CV/%
5	5.11±0.35	93.17~106.83	6.83
10	10.52±0.57	94.63~105.37	5.37
20	20.50±1.20	94.15~105.50	5.85
50	49.68±0.59	98.82~101.18	1.18
100	102.25±1.12	98.91~101.09	1.09

表11 MELISA对自来水中OLA添加回收率检测结果

Table 11 Spiked recovery rate of OLA in tap water determined by MELISA

添加质量浓度/（ng/mL）	检测值/（ng/mL）	回收率/%	CV/%
5	5.13±0.19	96.19~103.81	3.81
10	9.75±0.58	94.34~105.66	5.66
20	21.05±0.58	97.22~102.78	2.78
50	50.92±1.57	96.85~103.15	3.15
100	103.54±2.08	97.92~102.08	2.08

2.12 HPLC验证结果

HPLC测定OLA的标准曲线见图9，线性回归方程为y=47 926x+2 299.6（R^2=0.999 7），R^2接近1，表明该标准曲线的线性关系良好。

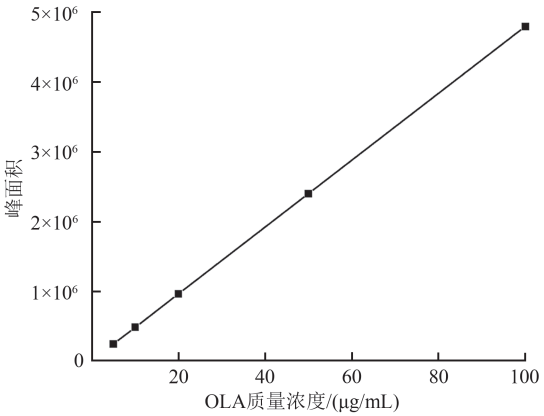


图9 HPLC测定下的标准曲线

Fig. 9 Standard curve determined by HPLC

采用HPLC和MELISA分别对饲料样品中的OLA进行检测，结果见表12~13。HPLC法测定的OLA回收率为97.66%~102.34%，CV较低，说明该方法检测结果稳定可靠。MELISA测定的OLA回收率为96.99%~103.01%，且所有CV均小于4%，表明该研究建立的MELISA检测结果可靠，能够满足对OLA的现场快速检测需求。

表12 HPLC法测定饲料中OLA添加回收率结果

Table 12 Spiked recovery of OLA in feed determined by HPLC

添加质量分数/（μg/g）	检测值/（μg/g）	回收率/%	CV/%
6	5.08±0.12	97.66~102.34	2.34
10	10.15±0.21	97.85~102.14	2.14
20	20.36±0.35	98.29~101.71	1.71

表13 MELISA测定饲料中OLA添加回收率结果

Table 13 Spiked recovery of OLA in feed determined by MELISA

添加质量分数/(ng/g)	检测值/(ng/g)	回收率/%	CV/%
6	5.59±0.15	97.27~102.73	2.73
10	10.02±0.11	98.85~101.15	1.15
20	19.17±0.58	96.99~103.01	3.01

3 结论

该研究建立了一种以免疫磁珠为固相载体的MELISA。体系优化后得到的线性回归方程为y=13.593ln x+17.173（R^2=0.994 3），IC_{10}值为0.59 ng/mL，IC_{50}值为11.19 ng/mL。与现有方法相比，该方法的IC_{10}值和IC_{50}值更低，灵敏度更高；相对标准偏差为0.46~2.72，表明其稳定性良好。该研究建立的MELISA与传统的ELISA法相比，具有前处理简单、检测快速、成本低廉等优势，且具备更大的固定表面积、更高的捕获效率、更短的孵育时间，同时不与试验材料反应[25]，还可实现高通量测试[26]。此外，与HPLC检测法相比，该方法在拟合度、灵敏度和稳定性方面均表现良好。

然而，当前研究亦存在一定的局限性。免疫磁珠与抗体偶联过程中会受免疫磁珠粒径影响，大粒径免疫磁珠虽然能够偶联更多抗体，但容易发生聚沉现象，导致偶联失败或偶联成功的免疫磁珠无法有效捕获抗原，进而影响后续检测效果。为突破这一瓶颈，后续研究将聚焦以下关键方向以改进稳定性与提升偶联效率。一方面，着力于免疫磁珠表面修饰，如引入亲水性的聚乙二醇链以减少非特异性吸附，增强在复杂溶液中的分散稳定性[27]；同时采用硅烷化修饰调控表面电荷，保障适宜的静电吸附力，为偶联营造稳定微环境[28]。另一方面，在提升偶联效率方面，可运用微流控技术精准调控免疫磁珠粒径，确保粒径均一以实现高效偶联[29]，并深入探究不同粒径免疫磁珠的偶联动力学差异，实现协同作用。因此，开发稳定性更优的免疫磁珠将成为未来研究的重点。综上，该研究建立的MELISA为OLA残留检测提供了新方法，也为食品安全及其他小分子药物检测提供理论依据和参考。后续围绕稳定性与偶联效率的改进研究，将进一步推动该方法的发展与应用。

参考文献

[1] 师真，杨在英，张瑞雨，等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测罗非鱼中喹乙醇及其衍生物[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11(6)：1803-1808.
SHI Z，YANG Z Y，ZHANG R Y，et al. Determination of olaquindox and its derivatives in tilapia mossambica by ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality，2020，11(6)：1803-1808.(in Chinese)

[2] 费丹，徐俊，广业兰，等. 基于量子点微球免疫层析法快速灵敏检测畜禽中的喹乙醇[J]. 分析试验室，2025，44(3)：418-423.
FEI D，XU J，GUANG Y L，et al. Quantum dot nanobeads-based lateral flow assay for rapid and sensitive detection of olaquindox in livestock[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory，2025，44(3)：418-423.(in Chinese)

[3] 孙雷，韩嘉媛，汪霞，等. 喹乙醇的毒理学研究概况[J]. 中国兽药杂志，2008，42(1)：41-44.
SUN L，HAN J Y，WANG X，et al. General situation of toxicological research on olaquindox[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug，2008，42(1)：41-44.(in Chinese)

[4] 李瑾瑾，刘彬，杨琳芬，等. 饲料中喹乙醇高效液相色谱检测方法优化[J]. 江西水产科技，2017(3)：18-21.
LI J J，LIU B，YANG L F，et al. Optimization of HPLC detection method for olaquindox in feed[J]. Jiangxi Fishery Science and Technology，2017(3)：18-21.(in Chinese)

[5] 张景艳，王磊，李建喜，等. 饲料中喹乙醇ELISA检测试剂盒的研制及性能分析[J]. 畜牧兽医学报，2013，44(8)：1297-1304.
ZHANG J Y，WANG L，LI J X，et al. Development and performance of ELISA kit for rapid detection of olaquindox in feed[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences，2013，44(8)：1297-1304.(in Chinese)

[6] 杨敏仪，罗雯倩，贾荣业，等. 基于多克隆抗体的糠氨酸ic-ELISA检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(5)：138-145.
YANG M Y，LUO W Q，JIA R Y，et al. Development of ic-ELISA for furosine detection based on polyclonal antibodies[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(5)：138-145.(in Chinese)

[7] 郝华. 用于海洋弧菌快速检测的免疫磁珠技术的研究[D]. 厦门：集美大学，2010.

[8] LI L，YIN D H，XU K，et al. A sandwich immunoassay for brucellosis diagnosis based on immune magnetic beads and quantum dots[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis，2017，141：79-86.

[9] 谢芳. 基于免疫磁珠的痕量黄曲霉毒素B_1快速富集及ELISA检测的研究[D]. 南昌：南昌大学，2013.

[10] KONG N，SONG S S，PENG J，et al. Sensitive，fast，and specific immunoassays for methyltestosterone detection[J]. Sensors，2015，15(5)：10059-10073.

[11] 王何瑶，梁赟，钟于红，等. 基于Expi 293F细胞的玉米赤霉烯酮重组全长抗体表达的研究[J]. 食品与生物技

术学报，2024，43（7）：67-76.
WANG H Y，LIANG Y，ZHONG Y H，et al. Study on expression of recombinant full-length antibodies against zearalenone based on Expi 293F cells[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43（7）：67-76.（in Chinese）
[12] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 2版. 北京：科学出版社，2005.
[13] 杨飞. 牛传染性鼻气管炎病毒gD蛋白单克隆抗体的制备和间接免疫荧光方法的建立[D]. 北京：中国兽医药品监察所，2020.
[14] 龚如月，于淑媛，王书博，等. 基于重组IBDV VP3蛋白的免疫磁珠间接ELISA抗体检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医科学，2019，49（6）：678-686.
GONG R Y，YU S Y，WANG S B，et al. Establishment and preliminary application of indirect ELISA with immunomagnetic beads based on recombinant IBDV VP3 protein for the detection of antibodies against the protein[J]. Chinese Veterinary Science，2019，49（6）：678-686.（in Chinese）
[15] 梅晨，李淑芳，黄明明，等. 副鸡禽杆菌外膜蛋白抗体间接ELISA检测方法的建立[J]. 中国兽医杂志，2019，55（6）：22-25，31.
MEI C，LI S F，HUANG M M，et al. Development of Indirect ELISA for Antibody of *Avibacterium paragallinarum* outer membrane protein[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine，2019，55（6）：22-25，31.（in Chinese）
[16] 王云云，石广革，孙嘉笛，等. 玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇双特异性抗体的制备及检测方法构建[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（11）：1-10.
WANG Y Y，SHI G G，SUN J D，et al. Preparation of bispecific antibodies against zearalenone and deoxynivalenol and construction of detection methods[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（11）：1-10.（in Chinese）
[17] 许淑美，王婉怡，朱志军，等. 基于熵权法优化温胆汤挥发油提取及包合工艺[J]. 中医学报，2025，40（2）：288-296.
XU S M，WANG W Y，ZHU Z J，et al. Optimization of volatile oil extraction and encapsulation process of Wendan decoction based on entropy weight method[J]. Acta Chinese Medicine，2025，40（2）：288-296.（in Chinese）
[18] 杨继飞. 磺胺嘧啶单克隆抗体的制备及其在免疫学检测中的应用[D]. 郑州：河南农业大学，2009.
[19] 何学令，何琳，别明江，等. 辨别生物医学论文图片真伪的工具与审读方法探索[J]. 编辑学报，2023，35（5）：564-569.
HE X L，HE L，BIE M J，et al. An exploration of tools and review methods for distinguishing the authenticity of biomedical paper images[J]. Acta Editologica，2023，35（5）：564-569.（in Chinese）
[20] 丁亚芳，贾良羲，邢维维，等. 基于免疫磁珠前处理的荧光免疫层析法定量检测牦牛肉中金刚烷胺[J]. 食品科技，2021，46（6）：294-300.
DING Y F，JIA L X，XING W W，et al. Quantitative detection of amantadine in yak beef by fluorescence immunochromatography based on pretreatment of immunomagnetic beads[J]. Food Science and Technology，2021，46（6）：294-300.（in Chinese）
[21] 孙朝男. 小鼠烧伤模型中巨噬细胞炎性标志物差异表达的研究[D]. 天津：天津医科大学，2021.
[22] 吴尚仪. 基于核酸提取与等温扩增一体化生物传感器的沙门氏菌快速检测方法研究[D]. 沈阳：沈阳农业大学，2023.
[23] 付萍. 牛支原体单克隆抗体、核酸适配体的筛选及应用[D]. 北京：中国农业大学，2014.
[24] 黄婧洁，李苗，陈莹娴，等. 基于免疫磁珠净化间接竞争酶联免疫吸附试验检测氟喹诺酮类药物[J]. 畜牧兽医学报，2023，54（2）：766-778.
HUANG J J，LI M，CHEN Y X，et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of fluorquinolones based on immunomagnetic bead purification[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica，2023，54（2）：766-778.（in Chinese）
[25] ZHANG B，LIU W T，LIU Z J，et al. Establishment of a chemiluminescence immunoassay combined with immunomagnetic beads for rapid analysis of ochratoxin A[J]. Journal of AOAC International，2022，105（2）：346-351.
[26] RESLOVA N，MICHNA V，KASNY M，et al. xMAP technology：applications in detection of pathogens[J]. Frontiers in Microbiology，2017，8：55.
[27] 周靖娥. 脂质纳米颗粒用于体内产生嵌合抗原受体T细胞及巨噬细胞的研究[D]. 上海：华东师范大学，2022.
[28] 张文君，吴梦婷，吕春艳，等. 介孔二氧化硅在药物递送系统及其体内外研究进展[J]. 生物技术通报，2019，35（12）：159-168.
ZHANG W J，WU M T，LÜ C Y，et al. Research progress of mesoporous silica in drug delivery system and its *in vitro* and *in vivo*[J]. Biotechnology Bulletin，2019，35（12）：159-168.（in Chinese）
[29] 吴子炜，罗诒财，韦银格，等. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物在口腔医学领域的应用[J]. 中国组织工程研究，2025，29（34）：7393-7404.
WU Z W，LUO Y C，WEI Y G，et al. Application of poly（lactic-co-glycolic acid）copolymer in stomatology[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research，2025，29（34）：7393-7404.（in Chinese）

（责任编辑：刘冬梅）