

水体中微囊藻毒素-LR 的间接竞争 ELISA 检测

盛建武, 何苗, 余少青, 施汉昌, 钱易

(清华大学环境科学与工程系环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要: 在自制包被完全抗原浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、单克隆抗体工作稀释度为 $1:3\,000$ 、酶标二抗鼠工作稀释度为 $1:3\,000$ 、微囊藻毒素-LR 浓度在 $0.001\sim 30\mu\text{g}/\text{L}$ 、显色底物为邻苯二胺, 采用间接竞争酶联免疫吸附试验对水体中的微囊藻毒素-LR 进行检测, 结果表明, 该方法与高效液相色谱的检测结果相关系数大于 0.99, 多次重复实验相对标准偏差小于 10%, 最低检测限能达到 $0.01\mu\text{g}/\text{L}$, 定量检测区间为 $0.01\sim 3\mu\text{g}/\text{L}$, 该方法对 [4-精氨酸] 微囊藻毒素能特异性识别, 对来自实际水样中的干扰有相当的耐受力。

关键词: 微囊藻毒素-LR; 单克隆抗体; 间接竞争 ELISA; 检测

中图分类号: X173; X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)06-1166-05

Detection of Microcystin-LR in Waters Using Indirect Competitive ELISA

SHENG Jian-wu, HE Miao, YU Shao-qing, SHI Han-chang, QIAN Yi

(ESPC State Key Joint Laboratory, Department of Environment Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was established to detect microcystin-LR in waters, with the concentration of the complete antigen was $5\mu\text{g}/\text{mL}$, the dilution of the monoclonal antibody was $1:3\,000$, the dilution of the enzyme tracer (goat anti-rabbit IgG-peroxidase) was $1:3\,000$, the concentration range of microcystin-LR was between $0.001\sim 30\mu\text{g}/\text{L}$, and using *o*-phenylenediamine as substrate. The assay showed a high relativity of more than 99% with high performance liquid chromatography, a mean relative standard deviation less than 10%, a detection limitation under $0.01\mu\text{g}/\text{L}$ and quantitative detection range was $0.01\sim 3\mu\text{g}/\text{L}$, high specificity for [4-arginine] microcystin, and it could still perform well under the influence from the samples.

Key words: microcystin-LR; monoclonal antibody; indirect competitive ELISA; detection

微囊藻毒素 (Microcystins, MCs) 是以微囊藻属 (*Microcystis*) 为主产生的一类蓝藻毒素^[1], 其中微囊藻毒素-LR (Microcystin-LR, MC-LR) 是目前已知急性毒性最强、危害最大的一种淡水蓝藻毒素^[2,3]. 目前水体中 MCs 的检测大多采用高效液相色谱方法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[4~8]. 近年来, 酶联免疫吸附检测 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 开始用于 MCs 的检测. 免疫检测技术由于其灵敏、快速、简单、便携、易用、适用现场分析等优点, 呈现出了较好的应用前景, 受到国外研究人员的广泛关注^[9~16], 国内也开展了许多关于微囊藻毒素的免疫检测研究^[17,18]. 本文利用兔血清白蛋白 (rabbit serum albumin, RSA) 自制合成了包被抗原 RSA-MC-LR^[19], 采用从 Alexis 公司获得的抗微囊藻毒素-LR 的单克隆抗体 (clone MC10E7), 建立了检测水体中 MC-LR 的间接竞争 ELISA (indirect competitive ELISA, ic-ELISA) 检测方法, 并对该方法进行了全面的评价; 同时还检测了不同的实际水样, 获得了较好的效果。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

聚苯乙烯 96 孔平板酶标板 (ELISA-Plate, Greiner bio-one, 德国). BIO-RAD 550 型酶标仪 (BIO-RAD, 加拿大). 酶标二抗: HRP-羊抗鼠 IgG (Sigma, A4416). 包被液: $0.05\text{mol}/\text{L}$ pH 9.6 碳酸缓冲液, 4°C 保存. 稀释液: $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS), 4°C 保存. 洗涤液: $0.01\text{mol}/\text{L}$ pH 7.4 PBS-Tween 20, 4°C 保存. 封闭液: 0.2% 鸡卵清蛋白, 用稀释液溶液; 底物: 邻苯二胺 (*o*-phenylenediamine, OPD) 溶液, 临用前配制 $0.1\text{mol}/\text{L}$ 柠檬酸 6.1mL ; $0.2\text{mol}/\text{L}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.4mL ; 蒸馏水 12.5mL ; 邻苯二胺 (sigma, P1526) 10mg ; 溶解后, 临用前加 30% H_2O_2 $40\mu\text{L}$. 终止液: $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 . 单克隆抗体

收稿日期: 2005-06-27; 修订日期: 2005-08-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2002AA649160)

作者简介: 盛建武 (1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为水污染控制。

MC10E7 (Alexis, ALX-804-320). MC-LR 标准品购自 Alexis 公司(产品号 ALX-350-012). 包被抗原(RSA-MC-LR)贮备液: 1mg/mL. MC-LR 标准梯度($\mu\text{g/L}$): 0, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30.

1.2 间接竞争 ELISA 标准曲线的获得

完全抗原浓度的确定: 利用 ic-ELISA, 检测半抗原. 分别做了 5, 10, 20, 40, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的包被抗原包被酶标板(每组设 3 个平行实验). 此时抗体工作稀释度按照抗体效价测定情况而定, 取效价测定时 $A_{490\text{nm}}$ 为 1.0 左右时的抗体稀释度; 酶标二抗稀释度采用产品说明书推荐的 1: 5 000.

抗体浓度(工作稀释度)的确定: ic-ELISA 中包被抗原浓度采用第 1 步作出的最佳包被浓度; 用 50 μL 标准浓度梯度的 MC-LR 和 50 μL 稀释比为 1: 1 000, 1: 2 000, 1: 3 000, 1: 4 000, 1: 5 000, 1: 10 000 的抗体(每组设 3 个平行实验)进行梯度试

验; 酶标二抗稀释度采用产品说明书推荐的 1: 5 000. 以进一步确定抗体合适的工作稀释度.

酶标二抗工作稀释度的确定: 酶标二抗推荐工作稀释度为 1: 5 000~ 1: 10 000. 为确定本实验中合适的酶标二抗的稀释度, 进行了如下实验: 利用 ic-ELISA, 包被抗原浓度采用第 1 步作出的最佳包被浓度; 抗体稀释度采用第 2 步作出的最佳抗体工作稀释度; 在加酶标物时加入 100 μL 按稀释比 1: 1 000, 1: 2 000, 1: 3 000, 1: 5 000, 1: 10 000(每组设 3 个平行实验)稀释的酶标二抗, 做梯度对比试验.

1.3 间接竞争 ELISA 的特异性分析

特异性指抗体对不同微囊藻毒素异构体的识别能力. 分别以标准浓度的微囊藻毒素衍生物作为 ELISA 检测对象, 评价实验结果.

用于特异性分析的 4 种微囊藻毒素(MC-LR, MC-RR, MC-LW, MC-LF)及 1 种节球藻毒素(Nodularin)均购自 Alexis 公司, 如表 1 所示.

表 1 用于特异性分析的藻毒素
Table 1 Specificity analysis with microcystins and nodularin

英文名称及缩写	中文名称	X(2)	Y(4)	分子量	产品编号
Microcystin LR, MC-LR	微囊藻毒素-LR	亮氨酸	精氨酸	995.2	ALX-350-012
Microcystin RR, MC-RR	微囊藻毒素-RR	精氨酸	精氨酸	1 038.2	ALX-350-043
Microcystin LW, MC-LW	微囊藻毒素-LW	亮氨酸	色氨酸	1025.2	ALX-350-080
Microcystin LF, MC-LF	微囊藻毒素-LF	亮氨酸	苯丙氨酸	986.2	ALX-350-081
Nodularin	节球藻毒素	(3) 精氨酸		825.0	ALX-350-061

同时将这几种毒素配置成与 MC-LR 相同的浓度梯度, 替换 MC-LR 标准浓度梯度进行 ic-ELISA 实验, 做出标准曲线, 计算 IC_{50} . 交叉反应性(cross reactivities, CR)即为各标准曲线的 IC_{50} 值计算得出的, 公式如下(为计算摩尔交叉反应性, 所有浓度均按 mol/L 计):

$$\text{CR} = \frac{\text{IC}_{50, \text{MC-LR}}}{\text{IC}_{50, \text{MC-XY}}} \times 100\%$$

1.4 高效液相色谱方法

HPLC 定量检测水样中 MC-LR 的仪器参数如下. 色谱柱: 色谱 C_{18} ODS 柱(4.6mm $\times$ 150mm), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$. 检测器参数: 紫外检测器, 检测波长 238nm. 流动相: 60% 甲醇, 40% 磷酸缓冲液(0.05mol/L pH = 3 的 KH_2PO_4). 总流速 1.0 mL/min, 进样量 10 μL . MC-LR 吸收峰出现在 11.4min 左右. 储备液和标准液配制: 将 0.500 mg 微囊藻标准品溶于 1.00 mL 甲醇中, 作为储备液. 用前再以甲醇稀释配制成标准梯度系列(0.1~ 30 $\mu\text{g/mL}$). 标准梯度如下($\mu\text{g/L}$): 0.1, 0.3, 1, 3, 10,

30(采用 60% 色谱纯甲醇+ 30% pH 3 磷酸缓冲液进行稀释).

在色谱分析条件下依次测定, 以峰面积对相应的进样浓度(MC-LR, $\mu\text{g/L}$) 进行线性回归. 实际样品测定时, 再根据峰面积按回归方程计算得到的 MC-LR 浓度.

1.5 实际水样检测分析

取不同来源的实际水样, 本研究采用的水样来自清华大学校内, 分别为本实验室自来水, 校河水(景观水), 近春园水(景观水)及游泳池水. 其中, 校河水浊度较大, 故先用 0.45 μm 的微滤膜过滤, 其它水样不做任何预处理. 在实验中, 同时测定原水以及添加了标准 MC-LR 梯度的水样. 控制添加 MC-LR 的最终浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1 $\mu\text{g/L}$ 4 个不同浓度. 每个水样平行测定 3 次, 根据标准曲线计算水样中 MC-LR 浓度, 并与原水进行比较.

为了减少基质效应, 使用了水样缓冲溶液. 在加入样品时, 先将样品缓冲液 10 μL + 水样 40 μL 充分混匀(同时配置可用于 3~ 5 个平行样的量), 再和

50 μ L 稀释比为 1:3 000 的酶标二抗羊抗鼠充分混匀后,依次加入孔中.其中水样缓冲液成分如下:0.1mol/L pH 7.4 PBS,其中包含 1mol/L NaCl,1% EDTA,1% BSA.

2 结果与讨论

2.1 ic-ELISA 标准曲线的建立及优化

间接竞争 ELISA 方案的确立主要包括包被抗原浓度、抗体工作稀释度以及酶标二抗工作稀释度 3 方面的内容.标准曲线的建立和优化主要从这 3 方面入手.

包被抗原浓度的确定和优化:将包被抗原浓度在 5~10 μ g/mL 时,试验效果较好,梯度明显,阴性孔颜色较深.对比包被抗原分别为 5 μ g/mL 和 10 μ g/mL 的试验效果(每组设 3 个平行试验)表明,二者的阴性孔和半抗原低浓度时的效果很接近,但在半抗原浓度较高时,5 μ g/mL 包被抗原本底值更低,本研究后续所有的间接 ELISA 均采用包被抗原的浓度为 5 μ g/mL.

抗体工作稀释度的确定和优化:抗体工作稀释度小于 1:1 000 时,结果表现为加底物后显色很快,颜色普遍很深,无梯度.原因应该是抗体浓度过高,致使包被抗原和游离的半抗原都能和抗体结合,因而颜色很深且没有梯度.抗体工作稀释比大于或等于 4 000 时,加底物后各孔颜色很浅,梯度不明显.其原因应该是抗体浓度过低(或放置时间过长,导致效价偏低),与固定抗原结合的抗体量极少,导致显色不深.抗体工作稀释度为 1:2 000 和 1:3 000 时,试验结果较为理想.但稀释度为 1:2 000 时,显色过快,不易控制,且易造成本底值偏高.因而本研究采用的最终抗体工作稀释度为 1:3 000.

酶标二抗工作稀释度的确定和优化:1:1 000 时,结果表现为加底物后显色很快不易控制,虽有梯度但本底值明显偏高许多.原因应该是与抗体结合的酶过多,导致催化反应加快,不易控制;同时由于酶浓度过高,非特异性吸附增强,致使本底值明显偏高.酶标二抗工作稀释度为 1:5 000 和 1:10 000 时,试验结果为显色很慢,颜色较浅,阴性孔颜色不高;若放置时间过长,则半抗原浓度较低的孔梯度不明显.主要原因应该是一抗能结合到的酶标二抗不多,使显色过程变长,显色不深.酶标二抗工作稀释度为 1:2 000 和 1:3 000 时,试验结果较为理想.本研究采用的最终的酶标二抗工作稀释度为 1:3 000.

2.2 ic-ELISA 的精密度及灵敏度分析

间接竞争 ELISA 的标准曲线如图 1 所示,采用 3 次平行实验($n=3$).从图 1 可以看出,曲线呈现明显的反 S 型,3 次平行实验重复性较好,标准偏差相对平均值而言,均在 10% 以内.阴性孔(MC-LR 浓度为 0)的 $A_{490\text{nm}}$ 为 0.872,50% 抑制浓度为 0.3 μ g/L,对 MC-LR 的最低检测限(即灵敏度)能达到 0.01 μ g/L.

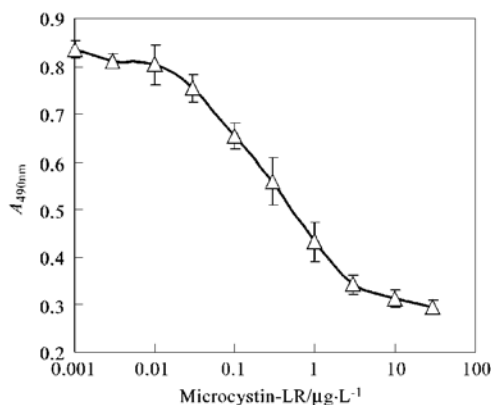


图 1 间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve obtained with indirect competitive ELISA

靠近 IC_{50} 的一段线形区间称为定量检测区间,实验表明,该方法的定量检测区间对应的浓度范围为 0.03~3 μ g/L,线形度良好,回归系数 $R^2=0.998$,如图 2 所示.

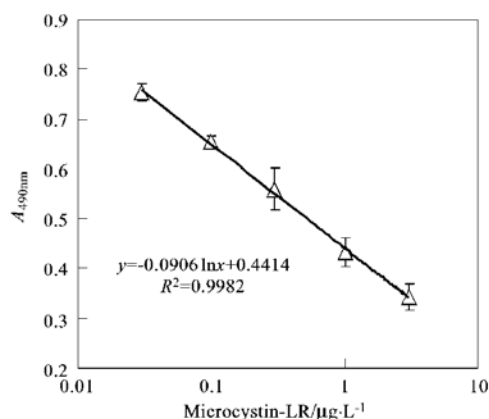


图 2 间接竞争 ELISA 定量检测范围

Fig. 2 The limit of quantitative detection

2.3 ic-ELISA 的准确度分析

HPLC 标准曲线如图 3 所示.

取自配水样进行 HPLC 和 ic-ELISA 检测,对 2 种检测结果分别以 MC-LR 的测定值对 MC-LR 的标准值作图,其相关性如图 4 所示.由图 4 看出二者的相关性较好,计算相关系数大于 99%.

2.4 ic-ELISA 的特异性(交叉反应)分析

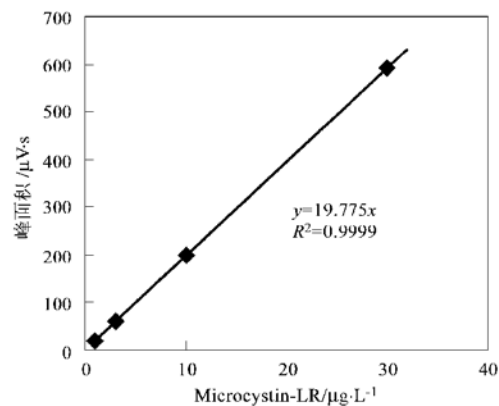


图 3 HPLC 标准曲线

Fig. 3 Standard curve obtained with HPLC

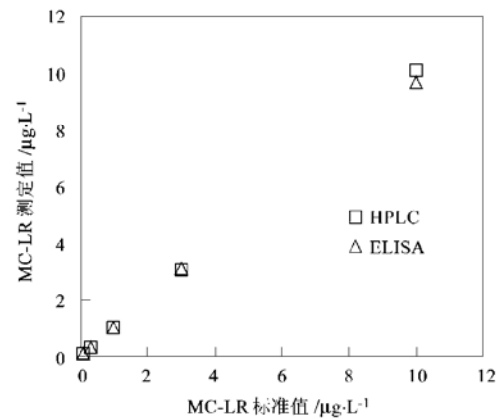


图 4 HPLC 和 ic-ELISA 检测结果比较

Fig. 4 Comparison detection results obtained by HPLC and ic-ELISA

分别测试了抗体与微囊藻毒素-LR、微囊藻毒素-RR、微囊藻毒素-LF、微囊藻毒素-LW 以及节球藻毒素的交叉反应性,结果如表 2 所示,表中列出了 5 种毒素分别参与竞争反应的 50% 抑制剂量、检测限以及交叉反应性。

表 2 MC10E7 的 50%抑制剂量 (IC₅₀) 和检测限

Table 2 IC₅₀ and detection limitation of MC10E7

被检物	IC ₅₀ ±S	检测限	交叉反应性	摩尔交叉反应性
	/μg·L ⁻¹	/μg·L ⁻¹	/ %	/ %
MC-LR	0.5±0.1	0.01	100	100
MC-RR	1.0±0.1	0.1	50±10	52±10.4
节球藻毒素	3±1	0.3	16.7±3.3	13.8±2.6
MC-LF	> 30	> 30	< 0.017	< 0.017
MC-LW	> 30	> 30	< 0.017	< 0.017

2.5 ic-ELISA 的基质效应分析

基质效应主要是评价抗体以及酶标记物(包括酶标抗原和酶标抗体)在 ELISA 操作过程中的抗干扰能力,即工作稳定性问题。干扰物主要来源于水样中,因此,整个 ELISA 过程中,加水样是干扰最大的

一个环节。一般主要考虑所加水样的 pH 值及其可能含有的有机溶剂、腐殖质酸、表面活性剂及重金属等。评价基质效应就是考查这些干扰因素对 ic-ELISA 稳定性的影响。

不同的 ELISA 类型,容易受干扰的对象不一样,对于 ic-ELISA,只需考虑抗体的抗干扰能力,因为包被抗原可以忽略,而后一步添加的酶标二抗由于洗板而受水样的影响较小。Zeck 等人研究了直接竞争 ELISA 中单克隆抗体 MC10E7 的稳定性。他们的研究表明一般情况下,抗体比酶标记物对干扰物质的耐受力要强^[20]。由于干扰物质对抗体稳定性的影响没有特异性,所以这里参考了 Zeck 等人的样品缓冲液配制方法,在加入待测实际水样时,先将其与一定量样品缓冲液(其中含有高浓度的磷酸盐、BSA、EDTA 等)混合,再与抗体混合加入孔中,这样可在很大程度上减少基质效应^[20]。

2.6 实际水样检测结果分析

计算各水样($n=3$)测定的平均值和相对标准偏差,利用上面给出拟合公式计算对应的 MC-LR 的浓度,用该浓度除以所添加的 MC-LR 浓度,得出 MC-LR 的回收率。计算所添加的 MC-LR 浓度和计算所得的 MC-LR 浓度这两者的相关性。各实际水样的相关数据详见表 3。各水样原水均未检测出 MC-LR ($<10\text{ng/L}$)。各水样检测结果精确度较好(变异系数均小于 10%),并且与投加的标准 MC-LR 有较好的相关性(相关系数 >0.98);各样品的回收率介于 69%~120% 之间。

3 结论

(1) 在自制包被完全抗原浓度为 $5\mu\text{g/mL}$ 、单克隆抗体工作稀释度为 1:3 000、酶标二抗鼠工作稀释度为 1:3 000、微囊藻毒素-LR 浓度在 $0.001\sim30\mu\text{g/L}$ 、邻苯二胺为显色底物,采用间接竞争 ELISA 对水体中的 MC-LR 进行检测,能获得较好的检测效果。该方法与高效液相色谱的检测结果相关系数大于 0.99;平行实验相对标准偏差小于 10%;最低检测限能达到 $0.01\mu\text{g/L}$,定量检测区间为 $0.01\sim3\mu\text{g/L}$;特异性较好,对[4-精氨酸]微囊藻毒素特异识别。

(2) 用该方法检测了 4 个加入了不同微囊藻毒素-LR 浓度不同来源的实际水样。各水样原水均未检测出微囊藻毒素-LR($<10\text{ng/L}$),检测结果相对标准偏差均小于 10%,与投加的标准微囊藻毒素-LR 相关系数大于 0.98,样品的回收率在 69%~

表 3 实际水样分析结果

Table 3 Detection results of wild samples

水样来源	原水中 MC-LR / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	加入的标准 MC-LR / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	加 MC-LR 后检测结果 / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	变异系数 CV / %	回收率 / %	相关系数 p
清华大学自来水	< 0.01	0.1	0.073	4.2	73	0.987
		0.2	0.237	3.8	119	
		0.5	0.599	5.0	120	
		1	0.955	8.6	95	
清华大学校河水	< 0.01	0.1	0.076	3.6	76	0.998
		0.2	0.158	4.9	79	
		0.5	0.404	6.7	81	
		1	0.914	4.2	91	
清华大学近春园水	< 0.01	0.1	0.109	4.4	109	0.997
		0.2	0.209	7.5	105	
		0.5	0.516	8.3	103	
		1	0.895	4.5	89	
清华大学游泳池水	< 0.01	0.1	0.069	7.1	69	0.999
		0.2	0.177	5.7	88	
		0.5	0.488	5.3	98	
		1	1.129	6.0	113	

120% 之间.

参考文献:

[1] Ingrid C, Jamie B. Toxic Cyanobacteria in Water[M]. London and New York: E & FN Spon Publisher, 1999, 416.

[2] Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production [J]. Phycologia, 1996, **35**(Suppl 6): 12~ 24.

[3] 韩志国, 郑解生, 谢隆初. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展 [J]. 暨南大学学报, 2001, **22**(3): 129~ 135.

[4] Dahlmann J, Budakowski Wes R, Luckas B. Liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins [J]. Journal of Chromatography A, 2003, **994**(1-2): 45~ 57.

[5] Rivasseau C, Martins S, Hennion M C, *et al.* Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 1998, **799**(1-2): 155.

[6] Lawrence James F, Menard Cathie. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample cleanup employing immunoaffinity chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2001, **922**(1-2): 111~ 117.

[7] Agute E C, Gago-Martínez A, Leão J M, *et al.* HPLC and HPCE analysis of microcystins RR, LR and YR present in cyanobacteria and water by using immunoaffinity extraction [J]. Talanta, 2003, **59**(4): 697~ 705.

[8] Ortea Paloma Muñoz, Allis Orla, Healy Brendan M, *et al.* Determination of toxic cyclic heptapeptides by liquid chromatography with detection using ultraviolet, protein phosphatase assay and tandem mass spectrometry [J]. Chemosphere, 2004, **55**(10): 1395~ 1402.

[9] Kondo Fumio, Ito Yuko, *et al.* Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column [J]. Toxicon, 2002, **40**(7): 893~ 899.

[10] Fontal O I, Vieytes M R. A fluorescent microplate assay for microcystin-LR [J]. Analytical Biochemistry, 1999, **269**(2): 289~ 296.

[11] Mikhailov Andrey, Härmä Braskén AnriSofi, Meriluoto Jussi, *et al.* Production and specificity of mono and polyclonal antibodies against microcystins conjugated through N-methyldehydroalanine [J]. Toxicon, 2001, **39**(4): 477~ 483.

[12] Rivasseau Corinne, Hennion Marie-Claire. Potential of immunoextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, **399**(1-2): 75~ 87.

[13] Tsutsumi Tomoaki, Nagata Satoshi, Yoshida Fuyuko, *et al.* Antidiotype monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay [J]. Toxicon, 1998, **36**(2): 235~ 245.

[14] Ueno Y, Nagata S. ELISA analysis of microcystins, algal hepatotoxins, in environmental water [J]. Toxicon, 1997, **35**(4): 482~ 483.

[15] Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, *et al.* Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity [J]. Nat. Toxins, 1995, **3**(2): 78~ 86.

[16] Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, *et al.* A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody [J]. Nat. Toxins., 1999, **7**(2): 49~ 55.

[17] 雷腊梅, 甘南琴, 宋立荣, 等. 三种检测微囊藻毒素的 ELISA 方法比较研究 [J]. 高技术通讯, 2004, **7**: 89~ 92.

[18] Lei La Mei, Wu Ying Song, *et al.* An ELISA-like time-resolved fluorescence immunoassay for microcystin detection [J]. Clinica Chimica Acta, 2004, **348**(1-2): 177~ 180.

[19] 盛建武, 何苗, 钱易, 等. 微囊藻毒素-LR 完全抗原的设计及制备 [J]. 环境科学, 2005, **26**(3): 33~ 37.

[20] Zeck Anne, Eikenberg Anja. Highly sensitive immunoassay based on a monoclonal antibody specific for [4-arginine] microcystins [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, **441**(1): 1~ 13.