



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101871936 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 27

(21) 申请号 201010196590. 1

(22) 申请日 2010. 06. 03

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 胥传来 宋珊珊 林菲 赵媛 赵书阁 刘微波

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

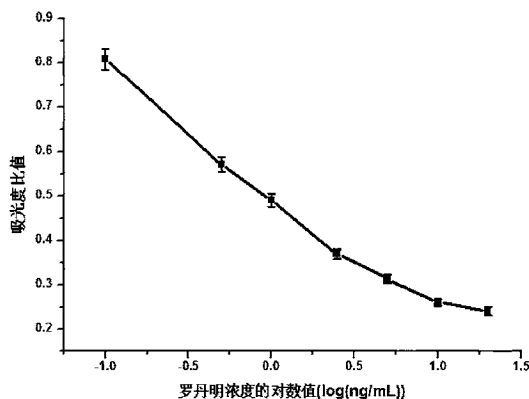
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法

(57) 摘要

一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法,属于酶联免疫检测 (ELISA) 技术领域。本发明公开了一种罗丹明 B 多克隆抗体酶联免疫检测方法,利用合成的罗丹明 B 免疫原免疫健康的新西兰大白兔得到多克隆抗体,以罗丹明 B 为标准品,以罗丹明 B 半抗原与 OVA 的偶联物作为包被原,建立了罗丹明 B 的间接 ELISA 方法,为罗丹明 B 的残留检测提供了快速高效的检测方法,由于采用的是多克隆抗体,费用较低并且稳定性和重复性较好。检测限 (IC₉₀) 为 0. 028ng/mL、半数抑制量 (IC₅₀) 为 1. 3ng/mL 和检测范围 (IC₂₀~ IC₈₀) 为 0. 07 ~ 17. 5ng/mL。免疫反应的高特异性和亲和性使 ELISA 检测罗丹明 B 具有极高的选择性和灵敏度。



1. 一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法,其特征在于利用合成的罗丹明 B 免疫原免疫健康白兔得到多克隆抗体,以罗丹明 B 为标准品,以罗丹明 B 半抗原与 OVA 的偶联物作为包被原,建立调味品中的罗丹明 B 的间接竞争酶联免疫检测方法;步骤如下:

(1) 以 0.05M 的碳酸盐缓冲溶液稀释罗丹明 B-OVA 包被原,稀释质量比为 1 : 1000 ~ 1 : 64000,稀释后加入酶标板中,每孔 100 μ L;4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,封闭、洗涤;

(2) 将系列浓度梯度的罗丹明 B 标准品加入酶标板中,每孔 50 μ L;同时加入以抗体稀释液稀释为 1 : 1000 ~ 1 : 4000 的多克隆抗体,每孔 50 μ L;37 $^{\circ}$ C 竞争 0.5h 后以含吐温的磷酸盐缓冲液 PBST 洗涤 3 ~ 5 次,加入以抗体稀释液稀释为 1 : 1000 ~ 1 : 3000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 GAR-HRP,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 作用 0.5h 后以 PBST 洗涤 3 ~ 5 次;

所述 PBST 溶液:含 0.05% Tween-20 的 0.01M PBS 溶液;

所述封闭液:含 0.1% 明胶的 pH 9.6、0.05M 碳酸盐缓冲溶液;

所述抗体稀释液:含 0.1% 明胶的 PBST 溶液;

(3) 配置显色液

A 液:配方为每 100mL 超纯水中加入 0.933g 柠檬酸,3.68g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,18 μ L30% H_2O_2 ;

B 液:配方为 60mg 四甲基联苯胺溶于 100mL 乙二醇中;

使用前将 A 液与 B 液以 5 : 1 体积比混合;

(4) 加入显色液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 显色 15min;加入终止液 2M 硫酸溶液,酶标仪 450nm 测吸光值 OD;根据不同浓度罗丹明 B 标准液的吸光值绘制罗丹明 B 浓度 - 吸光值标准曲线;

(5) 调味品的提取液作为样品溶液,直接加样于微孔中,进行 ELISA 测定,酶标仪 450nm 测吸光值 OD,对照标准曲线测出调味品的罗丹明 B 浓度。

2. 根据权利要求 1 所述的罗丹明 B 酶联免疫检测方法,其特征在于调味品的提取方法为:

(1) 以 1-5ng/g 水平的罗丹明 B 加入阴性样品,在室温下至少静置 15min;

(2) 取辣椒粉 1g,加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷,振摇 10min,静置或过滤使分离出上层清液;残渣加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷重复提取一次,合并 2 次提取液,混匀;

(3) 移取提取液于氮吹仪上吹干,用 0.01M 的 PBS 重溶;

(4) 移取 50 μ L 重溶液,作样品溶液,直接加样于微孔中,进行 ELISA 测定。

一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法,涉及一类色素残留检测方法,更具体的说是用酶联免疫吸附方法 (ELISA) 检测罗丹明 B 的残留。属于酶联免疫检测 (ELISA) 技术领域。

背景技术

[0002] 罗丹明 B (Rhodamine B) 为三苯甲烷类碱性染料,具有潜在的致癌和致突变性,我国和欧盟等都不允许在食品中使用。它是一种具有鲜桃红色的人工合成的染料,在溶液中有强烈的荧光,用作实验室中细胞荧光染色剂、有色玻璃、特色烟花爆竹等行业,不容许用作食品染色。罗丹明 B 具有脂溶性,会被非法用作调味品 (主要是辣椒粉和辣椒油) 染色剂。使用了被污染的调味品制作食品时会造成残留。调味品使用罗丹明 B 染色时含量较高,甚至直接掺入,可进行现场检测。食品中因其含量较低,需送实验室检测。

[0003] 罗丹明 B 残留分析方法,主要包括高效液相法 (HPLC),尽管这些方法灵敏度较高,但样品的前处理步骤较多,相对费时且检测费用较高,特别是不适用于大量样品的筛选。

[0004] 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 提供了一种痕量罗丹明 B 的快速、灵敏、选择性检测方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的建立了罗丹明 B 残留 ELISA 检测方法,为罗丹明 B 残留检测提供了快速高效的检测手段,由于采用的是多克隆抗体,费用较低并且稳定性和重复性较好。检测限 (IC₉₀) 为 0.028ng/mL、半数抑制量 (IC₅₀) 为 1.3ng/mL 和检测范围 (IC₂₀ ~ IC₈₀) 为 0.07 ~ 17.5ng/mL。

[0006] 本发明的技术方案:一种罗丹明 B 酶联免疫检测方法,利用胥传来,宋珊珊,林菲 (一种罗丹明 B 人工抗原的合成方法 [P]. 中国专利:CN200910031727.5) 合成的罗丹明 B 免疫原免疫健康白兔得到多克隆抗体,以罗丹明 B 为标准品,以罗丹明 B 半抗原与 OVA 的偶联物作为包被原,建立调味品中的罗丹明 B 的间接竞争酶联免疫检测方法。

[0007] 本发明通过以下步骤实现:

[0008] (1) 以 0.05M 的碳酸盐缓冲溶液稀释罗丹明 B-OVA 包被原,稀释质量比为 1 : 1000 ~ 1 : 64000,稀释后加入酶标板中,每孔 100 μ L ;4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,按照常规 ELISA 方法封闭、洗涤;

[0009] (2) 将系列浓度梯度的罗丹明 B 标准品加入酶标板中,每孔 50 μ L ;同时加入以抗体稀释液稀释为 1 : 1000 ~ 1 : 4000 的多克隆抗体,每孔 50 μ L ;37 $^{\circ}$ C 竞争 0.5h 后以含吐温的磷酸盐缓冲液 PBST 洗涤 3 ~ 5 次,加入以抗体稀释液稀释为 1 : 1000 ~ 1 : 3000 的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 (GAR-HRP),每孔 100 μ L ,37 $^{\circ}$ C 作用 0.5h 后以 PBST 洗涤 3 ~ 5 次;

[0010] 所述 PBST 溶液:含 0.05% Tween-20 的 0.01M PBS 溶液;

[0011] 所述封闭液:含 0.1% 明胶的 pH 9.6、0.05M 碳酸盐缓冲溶液;

- [0012] 所述抗体稀释液:含 0.1%明胶的 PBST 溶液;
- [0013] (3) 配置显色液
- [0014] A 液:配方为每 100mL 超纯水中加入 0.933g 柠檬酸,3.68g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,18 μL 30% H_2O_2 ;
- [0015] B 液:配方为 60mg 四甲基联苯胺溶于 100mL 乙二醇中;
- [0016] 使用前将 A 液与 B 液以 5 : 1 体积比混合。
- [0017] (4) 加入显色液 100 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 显色 15min;加入终止液 2M 硫酸溶液,酶标仪 450nm 测吸光值 (OD);根据不同浓度罗丹明 B 标准液的吸光值绘制罗丹明 B 浓度 - 吸光值标准曲线;
- [0018] (5) 调味品的提取液作为样品溶液,直接加样于微孔中,进行 ELISA 测定,酶标仪 450nm 测吸光值 OD,对照标准曲线测出调味品的罗丹明 B 浓度。
- [0019] 调味品的提取方法为:
- [0020] (1) 以 1-5ng/g 水平的罗丹明 B 加入阴性样品,在室温下至少静置 15min;
- [0021] (2) 取辣椒粉 1g,加入 10mL 含 20%丙酮的正己烷,振摇 10min,静置或过滤使分离出上层清液;残渣加入 10mL 含 20%丙酮的正己烷重复提取一次,合并 2 次提取液,混匀;
- [0022] (3) 移取提取液于氮吹仪上吹干,用 0.01M 的 PBS 重溶;
- [0023] (4) 移取 50 μL 重溶液,作样品溶液,直接加样于微孔中,进行 ELISA 测定。
- [0024] 更详细的步骤为:
- [0025] 主要溶液配制
- [0026] 1) 配制磷酸盐 0.01M(PBS) 缓冲液:
- [0027] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.62g
- [0028] KH_2PO_4 0.2g
- [0029] NaCl 0.2g
- [0030] KCl 8.0g
- [0031] 加超纯水稀释至 1000mL。
- [0032] 2) 配制碳酸盐 (CBS) 缓冲溶液 (0.05M)pH9.6
- [0033] Na_2CO_3 1.59g
- [0034] NaHCO_3 2.93g
- [0035] 加超纯水稀释至 1000mL。
- [0036] 3) 配制 PBST 溶液:含 0.05% Tween-20 的 PBS 溶液。
- [0037] 4) 配制封闭液:含 0.1%明胶的 pH 9.6、0.05M 碳酸盐缓冲溶液。
- [0038] 5) 配制抗体稀释液:含 0.1%明胶的 PBST 溶液。
- [0039] 6) 显色液:
- [0040] A 液:0.933g 柠檬酸,3.68g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,18 μL 30% H_2O_2 用超纯水定容至 100mL。
- [0041] B 液:60mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 溶于 100mL 乙二醇中。
- [0042] 使用前将 A 液与 B 液以 5 : 1 体积比混合。
- [0043] 7) 终止液:2M 的 H_2SO_4 。
- [0044] 间接竞争 ELISA 实验方法的步骤如下:

[0045] 预先将罗丹明 B 标准品配制成 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲醇溶液作为工作母液, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。配制 PBST 溶液 (0.01mol/L、pH7.4、0.15mol/L NaCl, 0.5% Tween-20), 以此为基础配制系列反应液, 用以稀释竞争物标准液和抗血清 (多克隆抗体)。

[0046] a、包被: 用设定浓度的包被原包被酶联反应板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

[0047] b、洗涤: 用 PBST 洗涤反应板三次, 每次 3min, 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 然后甩干反应板。

[0048] c、封闭: 含 0.1% 明胶的 CBS, 200 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2h。

[0049] d、洗涤: 同 b。

[0050] e、竞争: 用 PBS 将罗丹明 B 母液稀释成 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20ng/mL 系列浓度, 另设一个 PBS 空白对照, 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。然后每孔加入 50 μL 稀释 4000 倍的抗血清, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 0.5h。

[0051] f、洗涤: 同 b。

[0052] g、加酶标二抗 (羊抗兔 HRP-IgG, 1 : 3000), 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 0.5h。

[0053] h、洗涤: 同 b。

[0054] i、显色: 加 TMB 配制的显色液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 显色 15min。

[0055] j、终止: 加终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。

[0056] k、测定: 用酶标仪检测 OD 450nm。

[0057] 本发明的有益效果: 以罗丹明 B 半抗原与 OVA 的偶联物作为包被原, 建立了罗丹明 B 的间接 ELISA 方法, 为罗丹明 B 的残留检测提供了快速高效的检测手段, 由于采用的是多克隆抗体, 费用较低并且稳定性和重复性较好。检测限 (IC_{90}) 为 0.028ng/mL、半数抑制量 (IC_{50}) 为 1.3ng/mL 和检测范围 ($\text{IC}_{20} \sim \text{IC}_{80}$) 为 0.07 ~ 17.5ng/mL。

附图说明

[0058] 图 1 罗丹明 B 的标准抑制曲线。

具体实施方式

[0059] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0060] 一、仪器:

[0061]	TGL-40B 台式低速离心机	上海安亭科学仪器厂
[0062]	KFLOW 纯水机	凯佛隆公司
[0063]	ZD-9556 水平摇床	太仓科教器材厂
[0064]	Costar 96 孔 8 \times 12 可拆酶标板	上海吉泰生物科技有限公司
[0065]	MuLtiska Mks 酶标仪	Thermo Labsystems 公司
[0066]	可调式移液器	Thermo Labsystems 公司
[0067]	涡旋混合器	上海沪西仪器分析

[0068] 二、试剂:

[0069]	辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-IgG)	康成生物工程公司
[0070]	四甲基联苯胺 (TMB)	华美生物工程公司
[0071]	其他试剂均为分析纯试剂	

[0072] 三、步骤

[0073] 1、免疫原和包被原的合成

[0074] 用混合酸酐法合成免疫原（罗丹明 B 半抗原与牛血清白蛋白 BSA 偶联），用碳二亚胺法偶联合成包被原（罗丹明 B 半抗原与卵清蛋白 OVA 偶联物），具体步骤如下：

[0075] 免疫原的制备

[0076] A 液：20mg 罗丹明 B 溶于 1mL DMF 中，全溶后冰浴下加 10 μ L 三丁氨混匀后再加 10 μ L 氯甲酸异丁酯磁力搅拌 1h；

[0077] B 液：40mg BSA 溶于 3mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0078] 冰浴下将 A 液逐滴加入 B 液中，然后置 4 $^{\circ}$ C 下温孵 3h，即得罗丹明 B 完全抗原混合液；

[0079] 透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60 $^{\circ}$ C 的去离子水冲洗 3min，保存在 4 $^{\circ}$ C 去离子水中备用；

[0080] 透析：将罗丹明 B 完全抗原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L（每次 2L，进行 2 次，下同）的 0.01M 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液和 2 \times 2L 的去离子水透析 3 天，最后使用冻干法将透析袋中的液体制成粉末，即得到罗丹明 B 完全抗原；

[0081] 包被原制备

[0082] A 液：10mg 罗丹明 B，6mg EDC（碳二亚胺），4mg NHS（羟基琥珀酸亚胺）溶于 2mL PBS（0.01M），磁力搅拌 3h。

[0083] B 液：15mg OVA 溶于 3mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中，4 $^{\circ}$ C 保存待用。

[0084] 将 A 液逐滴加入 B 液中，然后置 4 $^{\circ}$ C 下温孵 3 小时。即得包被原混合液。

[0085] 透析袋前处理：取 10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60 $^{\circ}$ C 的去离子水冲洗 3min，保存在 4 $^{\circ}$ C 去离子水中备用。

[0086] 将人工包被原混合液移入透析袋中，用 2 \times 2L 的 0.01M 的 PBS 溶液和 2 \times 2L 的去离子水透析 3 天。最后使用冷冻干燥法将透析袋中的液体制成粉末，即得到包被原罗丹明 B-OVA。

[0087] 2、抗血清（多克隆抗体）的制备

[0088] 1) 实验动物：选 14 只 2 月龄、体重为 1.5-2kg 的健康新西兰大白兔，雌雄各半，每两只为一个实验组。

[0089] 2) 抗原配置：将免疫原用生理盐水溶解，配成 2mg/mL 的溶液。

[0090] 3) 乳化：将上述溶液与等量完全或不完全福氏佐剂用混合搅拌法将其乳化，直至将一滴乳剂滴入水中，不散开漂在水面。

[0091] 4) 免疫方法：初次免疫将乳化好的试剂于兔子背部多点注射，1mL/只。初次免疫后的免疫称为加强免疫，加强免疫用福氏不完全佐剂乳化，加强免疫于肌肉注射，10d 加强免疫一次，剂量与初次免疫相同。

[0092] 5) 采血：4 次加强免疫后从耳缘静脉采血，采用间接酶联免疫法测定抗血清效价。待效价达到要求后，采用耳静脉放血与心脏放血相结合获得抗血清，收集于 50mL 灭菌塑料离心管中。

[0093] 6) 抗体的纯化和保存：以一定数量的 DEAE52 放入烧杯中，加入 0.01mol/L、pH 8.0PBS 缓冲液，静置 30min，去上清细粒，再重复一次。用布氏漏斗（内放两层滤纸）过滤。以 5g 湿重的 DEAE-纤维素加 1mL 血清及 3mL 蒸馏水混合液的比例，加入各成分，充分搅拌。

于 4℃ 中放置 1h, 中间搅拌数次。用布氏漏斗抽滤, 再用 0.01mol/L、pH 8.0PBS 缓冲液冲洗纤维素, 抽滤。滤液即为提取的 IgG 液。放于 20℃ 冰箱保存备用。

[0094] 3、ELISA 反应过程

[0095] 1) 将包被原用包被缓冲液作系列稀释包被 96 孔酶标板, 100 μ L/ 孔, 于 4℃ 冰箱过夜。次日取出酶标板回至室温, 每孔注入 200 μ L PBST 溶液, 摇床上振荡 3min, 用力甩掉洗涤液, 在吸水纸上拍干, 继续洗涤 2 次。以下洗涤方法相同。

[0096] 2) 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, 200 μ L/ 孔, 于 37℃ 温育箱内温育 2h 后取出烘干待用。

[0097] 3) 将阳性血清系列稀释对应加入到酶标板的前 7 行列, 第 8 行加入阴性血清, 100 μ L/ 孔, 37℃ 孵育 1h 后洗涤、拍干。

[0098] 4) 每孔加入 100 μ L, 1 : 3000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 1h 后洗涤、拍干。

[0099] 5) 每孔加入 100 μ L 显色液 (TMB 与底物液比例为 1 : 5), 暗处 37℃ 反应 15min, 取出后每孔加入 100 μ L 终止液 (2mol/L 的硫酸), 用酶标仪测定吸光值 A450。

[0100] 4、回收率及样品提取方法的确定

[0101] (1) 以 1ng/g 和 5ng/g 的水平加入罗丹明 B 样品, 在室温下至少静置 15min。

[0102] (2) 取辣椒粉 1g, 加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷, 振摇 10min, 静置或过滤使分离出上层清液, 残渣加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷重复提取一次, 合并 2 次提取液, 混匀。

[0103] (3) 移取提取液于氮吹仪上吹干, 用 PBS (0.01M) 重溶。

[0104] (4) 移取 50 μ L 样品溶液, 直接加样于微孔中, 进行 ELISA 测定。

[0105] (5) 回收率的计算: 根据不同添加浓度的样品 OD 值计算相应的抑制率, 再根据相应的抑制率从标准曲线上查到各自的浓度。检测浓度与真实浓度之比为对应浓度的回收率。

[0106] 试验结果如下:

[0107] 标准曲线: 本实验所获得的抗原检测的线性范围为 0.07 ~ 17.5ng/mL, 具体请见图 1。

[0108] 灵敏度: 灵敏度是所得 90% 最大吸光值所对应的标准品的浓度, 即 IC₉₀ 为 0.028ng/mL。

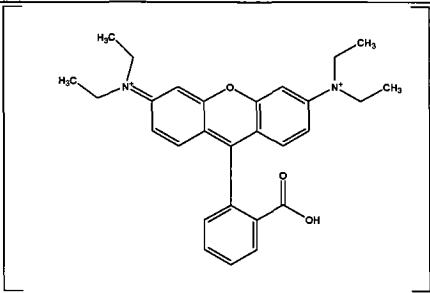
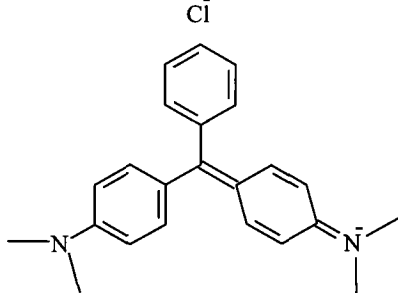
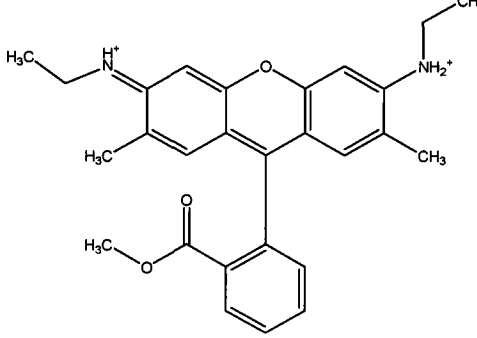
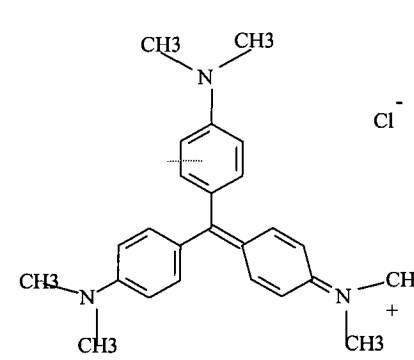
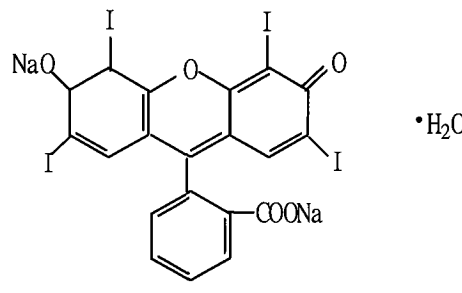
[0109] 交叉反应率 (CR %): 利用罗丹明 B 结构类似物进行交叉反应研究。

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{半抗原})}{IC_{50}(\text{罗丹明B})} \times 100\%$$
。由下表可知, 此抗体特异性很好。符合多残留 ELISA 方法检测的

要求。

[0110] 表 1 交叉反应率的测定

[0111]

	structure	name	CR(%)
1		罗丹明 B	100
2		孔雀石绿	0.08
3		罗丹明 6G	<0.01
[0112]		结晶紫	<0.01
5		赤藓红	<0.01

[0113] 回收率测定：

[0114] 加标样品回收后进行ELISA检测,回收率分别是67%~89%,变异系数小于20%。

[0115] 表2 加标回收率的测定 (n = 5)

[0116]

样品	添加水平 (ng/g)	回收率 (%)	变异系数 %	
			板内差异 (n=5)	板间差异 (n=3)
RB	1	67.87-86.19	8.10	11.82
	5	71.69-89.30	5.42	10.49

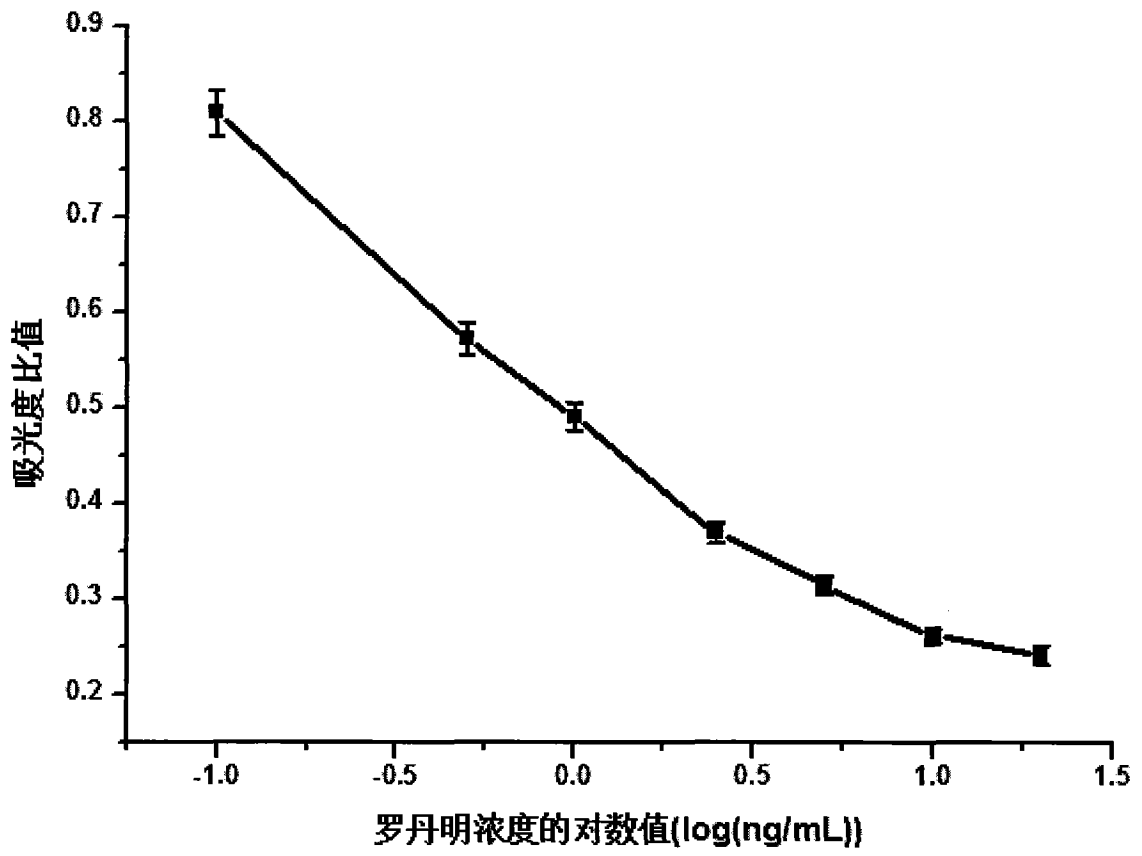


图 1

专利名称(译)	一种罗丹明B酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN101871936A	公开(公告)日	2010-10-27
申请号	CN201010196590.1	申请日	2010-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 宋珊珊 林菲 赵媛 赵书阁 刘微波		
发明人	胥传来 宋珊珊 林菲 赵媛 赵书阁 刘微波		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种罗丹明B酶联免疫检测方法，属于酶联免疫检测(ELISA)技术领域。本发明公开了一种罗丹明B多克隆抗体酶联免疫检测方法，利用合成的罗丹明B免疫原免疫健康的新西兰大白兔得到多克隆抗体，以罗丹明B为标准品，以罗丹明B半抗原与OVA的偶联物作为包被原，建立了罗丹明B的间接ELISA方法，为罗丹明B的残留检测提供了快速高效的检测方法，由于采用的是多克隆抗体，费用较低并且稳定性和重复性较好。检测限(IC90)为0.028ng/mL、半数抑制量(IC50)为1.3ng/mL和检测范围(IC20~IC80)为0.07~17.5ng/mL。免疫反应的高特异性和亲和力使ELISA检测罗丹明B具有极高的选择性和灵敏度。

