

有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计 及广谱特异性抗体的制备

刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 余向阳, 张存政

(江苏省农业科学院食品质量安全检测所, 南京 210014)

摘要: 【目的】制备针对有机磷农药的广谱特异性抗体, 用于有机磷农药的免疫快速筛选检测。【方法】设计采用二乙基膦酸乙酸作为通用结构半抗原, 用 NHS-DCC 法和 EDC 法合成两种人工抗原免疫新西兰大白兔制备抗血清。【结果】NHS-DCC 法所制得抗血清的最高滴度为 25 600, EDC 法合成的抗原制得的抗血清滴度最高为 6 400, 均获得免疫应答。以二乙基膦酸乙酸为对象建立的间接竞争 ELISA 检测方法对二乙基膦酸乙酸最低检测浓度 $0.0035 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 抑制中浓度 I_{50} 为 $0.182 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。经对 12 种常见磷酸酯类有机磷农药特异性检测反应试验, 结果发现: 所得抗体对毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷、辛硫磷等农药有特异性反应, I_{50} 分别为 0.12、0.21、0.24、0.78、0.97、3.8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。【结论】该检测技术可用于毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷等药剂的快速定性或半定量检测。

关键词: 有机磷杀虫剂; 广谱性抗体; 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

Use of Generic Hapten in Production of Broad Specificity Anti-Organophosphorous Pesticides Antibody

LIU Xian-jin, YAN Chun-rong, LIU Yuan, YU Xiang-yang, ZHANG Cun-zheng

(Food Safety Research and Inspection Center of Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to develop broad specificity polyclonal antibodies against a group of organophosphorous pesticides. 【Method】Diethylphosphono acetic acid (DPA) was used as a generic hapten, and conjugated to bovine serum albumin (BSA) by the mixed-anhydried method and EDC method. Six New Zealand white rabbits were immunized for preparation of antiserum. 【Result】The titers of antiserum by prepared the two methods had reached 25 600 and 6 400, respectively. The CI-ELISA was conducted with the antiserum, the detection limit for DPA was $0.0035 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and the I_{50} was $0.182 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The antiserum also showed high affinities to chlorpyrifos, omethoate, diazinon, parathion-ethyl, profenofos, and phoxin, the I_{50} to these pesticides were 0.12, 0.21, 0.24, 0.78, 0.97, 3.8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. 【Conclusion】It is concluded that this assay is a suitable screening tool for quantities and semi-quantities detection of the five organophosphorous pesticides.

Key words: Organophosphorous pesticides; Broad specificity antibody; Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

0 引言

【研究意义】有机磷农药是一类广谱高效杀虫剂, 广泛应用在农田害虫和卫生害虫的防治上。有机磷农药在杀虫剂中占据了相当重要的地位, 至今仍是世界上生产和使用最多的农药品种, 近年来仍有一些新品种投放市场。中国自 1982 年六六六、DDT 相继停产、

限用、禁用后, 有机磷农药的应用份额大幅增加。尽管有机磷农药大多数品种属非持久性农药, 但其大量使用必然会带来农产品中农药残留超标, 引起急性中毒, 对人、畜构成威胁。一些品种在动物体内蓄积作用和环境生物链的浓缩效应, 有机磷残留在中国是最突出的问题之一。因而急需建立一种快速高效的有机磷农药检测方法。【前人研究进展】传统的免疫学检

收稿日期: 2007-01-12; 接受日期: 2007-04-29

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA06Z411) 和国家自然科学基金项目(30471155)

作者简介: 刘贤进(1963-), 男, 江苏扬中人, 研究员, 研究方向为食品安全检测技术。Tel: 025-84390401; E-mail: jaasliu@jaas.ac.cn

测技术由于抗体具有特异性强的特点,通常一种抗体只能检测单种农药,难以满足实际检测时常常需要对多种农药同时检出的需求,广谱特异性抗体的制备与农药多残留免疫检测技术的发展应运而生,成为免疫学检测技术的发展趋势之一^[1]。【本研究切入点】国外在有机磷广谱特异性抗体制备方面已有一定报道,而国内在此方面研究则刚刚起步^[2,3],本研究旨在加快国内在此方面的理论与应用研究。【拟解决的关键问题】本文针对多种常见有机磷农药品种化学结构进行比较,设计采用二乙基膦酸乙酸作为通用结构半抗原模拟乙氧基有机磷农药结构用于抗体制备,为国内外首次报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Mercker), 环二己基碳酰亚胺(DCC, Mercker), 水溶性碳化二亚胺(EDC, Sigma-Aldrich), 二甲基甲酰胺(DMF, Sigma 进口分装), 卵清蛋白(OVA, Sigma 进口分装), 牛血清蛋白(BSA, Sigma 进口分装), 二乙基膦酸乙酸(Diethylphosphonoacetic acid, Sigma), 1, 4-二氧六环(上海元吉化工有限公司), 四甲基联苯胺(TMB, Sigma)、辣根过氧化物酶标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白(上海生物制品所)、弗氏完全佐剂(FCA, Sigma)、弗氏不完全佐剂(FICA, Sigma)。

毒死蜱、二嗪农、氧化乐果、乙基对硫磷、丙溴磷、辛硫磷、甲胺磷、马拉硫磷、甲基对硫磷、水胺硫磷、稻丰散、乐果农药标样均购于农业部药检所,其余试剂均为分析纯。

1.1.2 免疫动物 新西兰大白兔(江苏省农业科学院实验兔场)。

1.1.3 仪器 高速低温离心机(IEC), 分析天平(OHAUS), 紫外扫描仪(BECMAN DU640), 移液器(Jencons Sealpette), 酶标板(96孔, CORNING), 酶标仪(LABSYSTEM)等。

1.2 人工抗原的制备与鉴定

以二乙基膦酸乙酸为半抗原,该半抗原含有2个乙氧基,1个磷氧基,1个羧基(结构见图1)。其中羧基为可供与载体蛋白偶联的活性位点,通过活性酯法和碳化二亚胺法将其与牛血清蛋白和卵清蛋白偶联,形成既有免疫原性又有反应原性的人工抗原。具体方法如下:

1.2.1 活性酯(NHS-DCC)法 参照[1,2]取等摩尔量

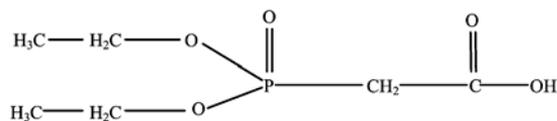


图1 二乙基膦酸乙酸结构图

Fig. 1 Structure of the hapten diethylphosphonoacetic acid

(0.1 mmol)的二乙基膦酸乙酸0.0196 g和NHS0.0109 g, 0.11 mmol DCC (0.0226 g), 加到玻璃管中,用1 ml 二氧六环将混合物溶解,室温下避光反应过夜,次日15 000×g离心10 min,去除沉淀,取上清液在35℃真空抽干,把残留物悬浮在3 ml 溶有20 mg BSA的硼酸钠缓冲液中。混合物在室温下磁力搅拌1 h, 4℃对1 L 磷酸盐缓冲液(PBS)pH 7.4透析过夜(换液4次)。包被抗原为抗原与OVA的偶联物,制备方法与免疫原相同。透析后的样品用紫外扫描仪进行全波长扫描鉴定偶联状况。经测定二乙基膦酸乙酸在232 nm处有最大吸收峰,根据各自的OD232和浓度分别计算摩尔吸光系数 ϵ_{232} ,按下式估算半抗原与载体蛋白的分子结合比,结合比= $[\epsilon_{232}(\text{偶联物})/\epsilon_{232}(\text{载体蛋白})]/\epsilon_{232}(\text{半抗原})$,以透析液做对照并测定蛋白浓度及偶联比率。

1.2.2 碳化二亚胺(EDC)法 参照董健^[3]方法,先称取二乙基膦酸乙酸0.0392 g溶于2 ml DMF中,低温搅拌,称取EDC8.0 mg溶于1 ml DMF中,缓慢加入到上述DMF中,另取BSA20 mg溶于2 ml DMF中,4℃搅拌,缓慢加入到上述混合液中,反应8 h,再于14℃反应过夜,次日2 000×g离心10 min,取沉淀,透析、鉴定步骤同上。

1.3 抗体的制备与分析

1.3.1 抗体的制备与纯化^[3] 2种抗原各免疫3只新西兰大白兔,免疫前1周分别采血制备阴性血清。免疫程序:首免,剂量为每千克兔子体重1 mg免疫原,加FCA将抗原制成油包水(W/O)乳浊液,背部皮下多点注射;隔2周第2次免疫,加FICA;此后,每隔3周免疫1次,方法同第2次免疫;第4次开始,每次免疫后一周兔耳缘静脉采少量血,分离血清,采用间接竞争ELISA法测定抗体效价。效价合格后,进行最后1次免疫,用加倍量抗原的生理盐水稀释液耳缘静脉注射,1周后心脏采血致死,分离抗血清,并采用辛酸-硫酸铵二步沉淀法纯化抗体,制成冻干粉,于-20℃保存备用。

1.3.2 抗体的鉴定及效价测定 利用方阵滴定法将

两种抗血清用两种包被原分别进行检测^[4], 确定最佳的抗原-抗体组合及其最佳工作浓度。

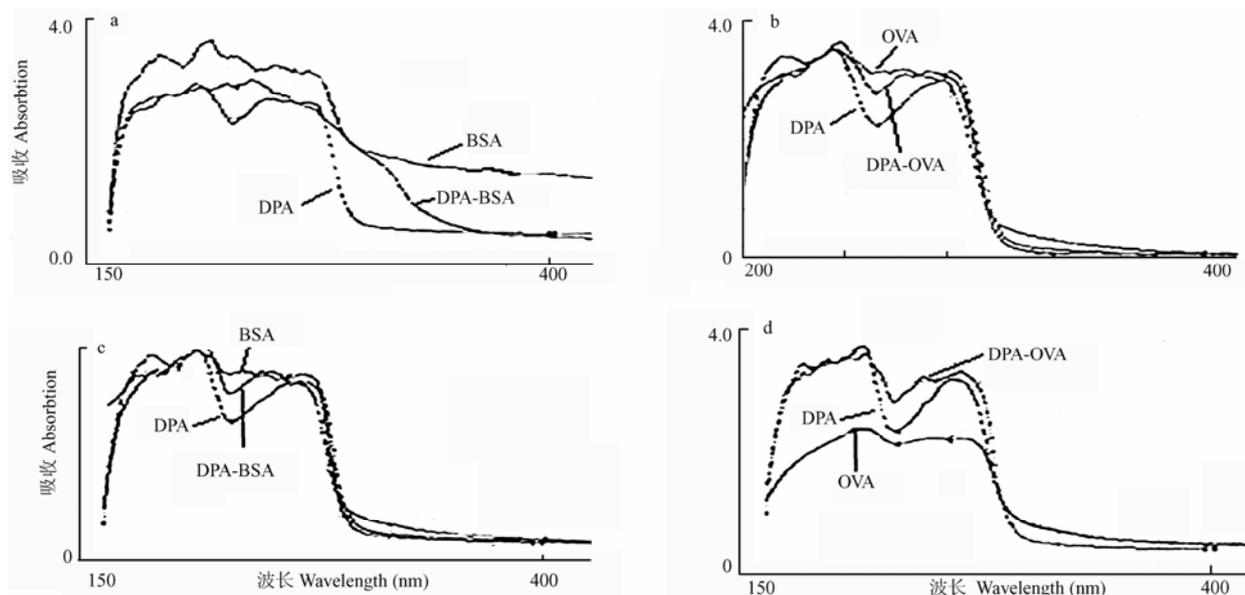
1.3.3 多种有机磷 ELISA 方法检测对象范围的确定
利用建立的抗原抗体最佳工作条件, 采用间接竞争 ELISA 法^[4]来分析不同种类的有机磷农药对该抗原-抗体结合反应的抑制作用。以二乙基磷酸乙酸为对象, 建立回归方程, 计算其 I_{10} 和 I_{50} 。选取 12 农药包括毒死蜱、二嗪农、氧化乐果、乙基对硫磷、丙溴磷、辛

硫磷、甲胺磷、马拉硫磷、甲基对硫磷、水胺硫磷、稻丰散、乐果, 将药剂抑制率对药剂浓度进行回归分析, 得出回归方程, 并计算各药剂对抗体反应的 I_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 半抗原-载体蛋白偶联情况鉴定

用紫外扫描仪对偶联物进行全波长扫描, NHS-DCC 法见图 2-a, 2-b。EDC 法见图 2-c, 2-d。



a. DPA-BSA; b. DPA-OVA; c. DPA-BSA; d. DPA-OVA

图 2 用活性酯法 (a、b) 与碳化二亚胺法 (c、d) 合成的人工抗原的紫外全波长扫描图

Fig. 2 UV spectra of conjugates, BSA, OVA and DPA

图 2-a 中 3 种物质由上到下分别是载体蛋白 BSA、载体蛋白 BSA 与半抗原偶联物、半抗原。可以看出在 254 nm 处半抗原有一波谷, 载体-抗原偶联物也有波谷出现, 二者在此处发生吸收峰的叠加。另外在 210 和 238 nm 处也有明显的吸收叠加现象。说明二者之间发生了反应, 可以推断半抗原和载体蛋白 BSA 成功偶联。根据上述推测方法, 可以确定图 2-b、2-c、2-d 中 3 种物质也已成功偶联。经紫外测定活性酯法制备的 DPA-OVA、DPA-BSA 偶联比分别为 25/1、20/1, EDC 法制备的 DPA-OVA、DPA-BSA 的偶联比分别为 16/1、20/1。

2.2 抗体鉴定与效价测定

由表 1 可以看出, 用 EDC 法合成抗原免疫动物的效果与活性酯法相比较差。活性酯法制备的抗原产生

的抗体对 EDC 法制备的抗原具有微弱的识别能力; EDC 制备的抗原产生的抗体对活性酯法制备的包被原没有任何作用。主要原因可能是 EDC 法制备的抗原不能使抗原决定簇充分暴露, 所以没有获得高度亲和力的抗体。4310 号兔子分泌抗体效价最高, 为 25 600, 以该抗体作为进一步研究。利用该抗体进行方阵滴定, 选择 OD=1 左右抗原、抗体浓度作为最佳工作浓度, 所得结果表明抗原、抗体最佳工作浓度均为 2 000 倍。

2.3 抗体对不同有机磷药剂的交叉反应

以二乙基磷酸乙酸为研究对象, 建立的回归方程为 $I=0.6614+0.2291gC$, $r=0.9699$, $I_{50}=0.1820 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $I_{10}=0.0035 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。多种有机磷药剂对抗体的 I_{50} 示于表 2。

从表 2 可以看出, 所得抗体对多种农药产生了识

表 1 抗体效价测定结果

Table 1 Titration of antibody

包被原 ¹⁾ Coating antigen	活性酯法 OP-BSA 抗体效价 ²⁾ Titration of antibody induced with antigen by active easter			EDC 法 OP-BSA 抗体效价 ²⁾ Titration of antibody induced with antigen by EDC		
	4324	4310	4316	4320	4343	4358
活性酯法制 OP-OVA Coating antigen by active easter	12800	25600	6400	-	-	-
EDC 法制备 OP-OVA Coating antigen by EDC	200	400	200	6400	3200	3200

¹⁾ 效价测定时两种包被抗原浓度均为 $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ²⁾ 效价以大于阴性血清吸光度值 2.1 倍计 ($P/N \geq 2.1$)

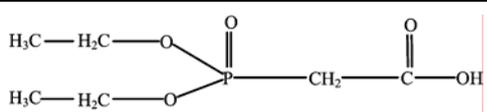
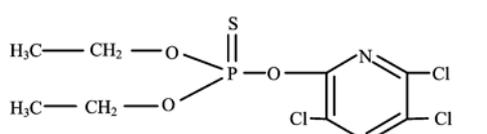
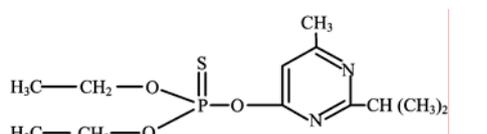
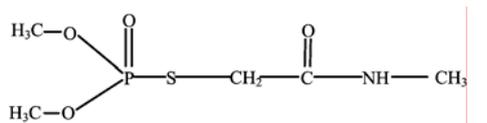
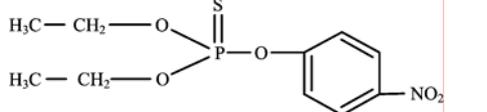
¹⁾ The concentrations of two coating antigens are $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; ²⁾ The titers of antiserum are defined as antiserum dilution that gave 2.1 times absorbance of the control serum

别反应。抗体对抗原先导物二乙基磷酸乙酸有较强的亲和力, I_{50} 为 $0.18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 试验设计的半抗原位于载体蛋白远端、暴露在外部的特征基团是 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -和 $\text{P}=\text{O}$ 。本方法制备的抗体在乐果和氧化乐果之间的选择性差异较大, 二者结构上的差别在于 $\text{P}=\text{O}$ 和 $\text{P}=\text{S}$ 键不同, 其余基团都相同。抗体对氧化乐果有很强的亲和力, 但对乐果的亲和力却很弱, 但是抗体又对毒死蜱、二嗪农和乙基对硫磷的这 3 种含有 $\text{P}=\text{S}$ 键的农药存在较好的交叉反应。另外抗体对毒死蜱、二嗪农、乙基对硫磷的 I_{50} 均小于 $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 辛硫磷为 3.8

$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 这 4 种农药都含有共同的结构 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -), 可以推测 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -是作为一个抗原决定簇而存在的, 起着非常重要的作用。抗体对含有一个 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -和一个 $\text{P}=\text{O}$ 的丙溴磷也有较好的识别作用, I_{50} 为 $0.97 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。水胺硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷等对抗原-抗体反应抑制能力较差, 说明抗体对这些药剂没有或只有微弱的识别能力。从以上的结果可以看出, 在二乙基磷酸乙酸羧基端偶联载体蛋白, 可以使磷酸基团上的 $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ -和一个 $\text{P}=\text{O}$ 充分暴露作为抗原决定簇, 刺激动物产生抗体, 对含有这一通用结构的有机磷类杀虫剂具有广泛的亲和力。

表 2 抗体对不同农药的交叉反应

Table 2 ELISA cross-reactions with different organophosphorous pesticides using the polyclonal antibody

名称 Name	结构 Structure	I_{50} ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
二乙基磷酸乙酸 Diethylphosphonoacetic acid		0.18
毒死蜱 Chlorpyrifos		0.12
二嗪农 Diazinon		0.24
氧化乐果 Omethoate		0.21
乙基对硫磷 Parathion-ethyl		0.78

续表 2 Continued table 2

名称 Name	结构 Structure	I ₅₀ (μg·ml ⁻¹)
丙溴磷 Profenofos		0.97
辛硫磷 Phoxim		3.8
甲胺磷 Methamidophos		-
马拉硫磷 Malathion		-
甲基对硫磷 Parathion-methyl		-
水胺硫磷 Isocarbophos		-
稻丰散 Phenthoate		-
乐果 Dimethoate		-

“-”代表未测出 (I₅₀ > 20 μg·ml⁻¹)

“-” no detection (I₅₀ > 20 μg·ml⁻¹)

3 讨论

3.1 抗体特异性研究

免疫分析法作为传统的有机磷色谱分析法的有力补充, 已经发展了多种农药的半定量和定量方法^[5-12]。

到 2005 年, 大约有 70 种以上的农药小分子化合物建立了免疫检测方法^[13]。传统的免疫检测法追求抗原-抗体识别的高度特异性, 一种抗体只针对性地检测一种抗原, 限制了农药免疫分析的应用。虽然抗体的高度特异性在进行痕量物质的低水平分析时是一种优

势,但在一些大型项目中对多种农药同时监测时却成为一种劣势,因为样品中常是多种农药残留同时存在。为此,分析学家们为实现抗体的广谱化开展了多方面的研究,主要有3条途径^[14,15]。研究最多的是利用交叉反应,Alcocer^[16]利用多克隆抗体的复杂性产生交叉反应可以检测10种以上的有机磷农药;Bruun^[17]利用单克隆抗体检测4种不同的三嗪类除草剂,Haasnoot^[18]利用单抗技术制备了广谱性单抗检测磺胺类药剂;还有报道利用基因工程合成抗体,使其具有多个识别位点而实现广谱性。制备广谱性抗体是将免疫法的分析范围由点到面进行扩散,将其真正引入实际应用的有效途径。

3.2 抗原的选择与制备

本文的研究中,选取具有羧基活性基团的二乙氧基磷酸结构,利用活性酯法使端部的羧基与载体蛋白发生反应,将二乙氧基磷酸基团作为抗原决定簇,得到了相对较广泛的有机磷农药检测范围。从毒死蜱、辛硫磷、丙溴磷、乙基对硫磷、二嗪农、氧化乐果等的结构来看制备的抗体与试验设想是基本一致的。Mcadam等研制磷酸酯类药剂杀螟松的单抗和多抗时,从3个途径对抗原进行改造,发现在—P=O键基团上连接一个三碳链羧酸后再与载体偶联得到的抗体对杀螟松的亲性和特异性最强,在其—NH₂上发生重氮化反应所得抗原制备的抗体亲和力和次之,在—NH₂上连接一个环状脂肪酸制备的抗体亲和力和最低。说明只有将抗原决定簇充分暴露,才能获得特异性、亲和力都很强的抗体。Alcocer^[16]报道,利用含有不饱和碳链羧酸的二乙氧基磷酸类似物作为抗原先导物,可以诱导机体产生对有机磷农药亲和力更高、识别范围更广泛的抗体。

4 结论

本文摒弃了传统免疫学方法追求抗体高度特异性的思路,利用抗体针对某些含有共有基团的农药会产生交叉反应,制备了多克隆抗体。因为抗原决定簇为多种有机磷农药的共有结构,而获得了广泛的识别能力,对部分农药的检测灵敏度较高。该技术经过进一步的优化,可以应用在有机磷农药毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷等的污染定性监测中,特别是可以作为一种筛选手段,应用于对大批量样本的快速筛选,可进一步与仪器分析定性定量检测相结合,从而减少仪器检测消耗。通用型免疫检测方法目前正处于探索阶段,其潜在优势和可行性有待进一步研

究。

References

- [1] Jones W T, Harvey D, Zhao Y F. Monoclonal antibody-based immunoassays for the phytotoxin coronatine. *Food and Agricultural Immunology*, 2001, 13: 19-32.
- [2] Lee J K, Ahn K C, Park O S. Development of an ELISA for the detection of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, 49: 2159-2167.
- [3] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. 酶免疫测定技术. 南京大学出版社, 1998: 60-129.
Ynag L G, Hu S C, Wei P H, Guo A Z. *Techniques of Enzyme Immunoassay*. Beijing: Nanjing University Press, 1998: 60-129. (in Chinese)
- [4] 董健, 刘贤进, 韩召军. 氟虫腈半抗原设计及抗体制备. 江苏农业学报, 2001, 17(3): 172-175.
Dong J, Liu X J, Han Z J. Hapten design and development of antibodies of Frionil. *Jiangsu Journal of Agricultural Science*, 2001, 17(3): 172-175. (in Chinese)
- [5] 仲维科, 郝戡, 樊耀波, 王敏捷. 食品农药残留分析进展. 分析化学, 2000, 28(7): 904-910.
Zhong W K, Hao J, Fan Y P, Wang M J. Progress of insecticide residue in food. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 28(7): 904-910. (in Chinese)
- [6] 王军, 朱鲁生, 林爱军, 李文海. 农药残留速测技术研究进展. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(1): 17-24.
Wang J, Zhu L S, Lin A J, Li W H. Advances in the study on rapid detection of pesticide residues. *Technique and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2001, 2(1): 17-24. (in Chinese)
- [7] 杨曼君. 农药残留的免疫分析法. 农药科学与管理, 1996, 60(4): 20-22.
Yang M J. Immunoassay of insecticide residues. *Pesticide Science and Administration*, 1996, 60(4): 20-22. (in Chinese)
- [8] 甄永苏, 邵容光. 抗体工程药物. 北京: 化学工业出版社, 2002: 95-96.
Zhen Y S, Shao R G. *Antibody Engineering Pharmaceuticals*. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 95-96. (in Chinese)
- [9] 李治祥, 黄士忠. 农药及其代谢物的酶免疫分析. 农业环境保护, 1998, 17(6): 245-247.
Li Z X, Huang S Z. EIA for pesticides and their metabolites. *Agro-environmental Protection*, 1998, 17(6): 245-247. (in Chinese)
- [10] 李宗霆, 周燮. 植物激素及其免疫检测技术. 江苏: 江苏科技

- 术出版社, 1996: 284-285.
- Li Z T, Zhou X. *Plant Hormones and Immunoassay*. Jiangsu: Jiangsu Science and Technology Press, 1996: 284-285. (in Chinese)
- [11] Conaway J E. New trends in analytical technology and methods for pesticide residue analysis. *Journal of AOAC International*, 1991, 74: 715-717.
- [12] Dun M X, Yu Y Y, Liu Y Q, Feng J t, Pan L G, Liu X J, He J, Zhang X. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for podophyllotoxin. *International Immunopharmacology*, 2005: 1583-1592.
- [13] Morozova V S, Levashova A I, Eremin S A. Determination of pesticides by pesticide by enzyme immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, 2005, 60(3): 202-217.
- [14] Spinks C A. Broad specificity immunoassay of low molecular weight food contaminants: new paths to Utopia. *Trends in Food Science and Technology*, 2000, 11: 210-217.
- [15] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 祝树德, 刘贤进. 拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的建立. *中国农业科学*, 2005, 38: 308-312.
- Luo A L, Yu X Y, Zhang C Z, Zhu S D, Liu X J. Development of enzyme immunoassays for pyrethroids. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38: 308-312. (in Chinese)
- [16] Alcocer M J C, Dillon P P, Manning B M, Doyen C, Lee H A, Daly S J, O'kennedy R, Morgan M R A. Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2000, 48: 2228-2233.
- [17] Bruun L, Koch C, Jakobsen M H, Aamand J. A new monoclonal antibody for the sensitive detection of cyanazine and other s-triazines in water by ELISA. *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12: 253-262.
- [18] Haasnoot W, Cazemier G, Du J, Kemmers-Voncken A, Bienenmann-ploum M. Sulphonamide antibodies: from specific polyclonals to generic monoclonals. *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12: 15-30.

(责任编辑 赵利辉, 毕京翠)