

# 有机磷杀虫剂多残留免疫分析技术研究进展

祁志军\*, 寇立泉, 王东方, 刘爽

(西北农林科技大学农药研究所, 杨凌 712100)

**摘要:** 有机磷杀虫剂是一类重要的农业生产资料, 在防治害虫和增加粮食产量方面发挥了极大的作用, 但由于其大量使用带来的环境问题越来越受到人们的关注。因此, 如何快速准确地检测其在农作物及环境中的残留、尤其是多种农药的残留, 一直是研究的热点。近年来, 基于抗原抗体特异性识别反应机理, 研究者在农药多残留免疫分析方面做了大量的探索。本文针对有机磷类杀虫剂的多残留免疫分析, 从采用混合抗体、多抗原决定簇抗体、共性结构抗体及单链可变区抗体几个方面做了详细地总结, 并对存在的问题进行了探讨, 以期今后的研究提供借鉴。

**关键词:** 有机磷; 多残留; 抗原; 免疫分析

## Research advance on multi-residue immunoassay of organophosphorus insecticides

QI Zhi-Jun\*, KOU Li-Quan, WANG Dong-Fang, LIU Shuang

(Institute of Pesticide, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**ABSTRACT:** Organophosphorus pesticides (OPs), a kind of important agricultural production material, have been playing an important role in pest control and food production increase. But more and more attention has been paid on the serious environmental problems because of the excess use of OPs. The quick and accurate detection of residues, especially the multi-residues of OPs is always a research focus. In recent years, a great deal of research and exploration has been made on the multi-analyte immunoassay of pesticides based on the specific recognition between antigen and antibody. This article reviewed the recent advances on the multi-residue determination of organophosphorus insecticides, including the progresses of mixed antibodies, antibodies against multi-antigenic determinants, antibodies against common moiety and single chain fragment variable (ScFv) antibodies, and discussed the existed problems and future research.

**KEY WORDS:** organophosphorus; multiresidue; antigen; immunoassay

农药作为人类文明发展的产物, 在提高农作物和经济作物产量与品质方面发挥了极为重要的作用。但农药的大量使用, 使得农产品中农药残留超标和环境污染等问题突出。另一方面, 为了降低抗药性产

生的风险和达到一喷多防的效果, 使用者采取了农药品种的轮用、混用和使用混配制剂等多种措施。从而导致在同一批农产品中, 不单是一种农药成分, 而是多种残留成分并存, 这就需要在样品分析时对多

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900955)、陕西省科技研究发展计划项目(2011K02-07)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900955) and Project of Scientific Research of Shaanxi (2011K02-07)

\*通讯作者: 祁志军, 副教授, 主要研究方向为新农药研究与开发及农药免疫分析。E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn

\*Corresponding author: QI Zhi-Jun, Associate Professor, Institute of Pesticide Research, Northwest A&F University, 61# Postbox, No. 22, Xinong Road, Yangling Demonstration Zone, Shaanxi 712100, China. E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn

种成分进行同时检测。

目前,农药多残留分析主要采用气相色谱和液相色谱等仪器分析的手段。近年来,随着计算机技术的快速发展和各种仪器的组合应用,仪器的检测灵敏度和速度都有了很大的提高,而且多种分析仪器的联合应用也使其检测谱越来越宽<sup>[1]</sup>。但是,仪器分析方法对样品前处理技术和操作人员的水平要求很高,而且由于不同农药品种的理化性质存在较大差异,其提取方法和所需的检测条件也各不相同,这些都限制了仪器分析在农药多残留检测中的应用。作为农药残留分析的另一大检测手段,农药免疫分析技术在一定程度上弥补了仪器分析的不足,近年来也取得了很大的进展。国内外学者已经制备出多种农药的单克隆或多克隆抗体,并建立了相应的痕量分析体系<sup>[2]</sup>。但在农药免疫分析技术应用初期,免疫分析往往只针对某一种化合物,人们把抗体的高特异性作为衡量抗体优劣的一个重要指标,认为抗体的交叉反应越弱,抗体质量越好,这种高特异性的抗体往往只能检测一种或少数几种农药。近年来,基于“抗原决定簇”理论,人们开展了农药多残留免疫分析技术的研究。多残留免疫分析又称为多组分分析物免疫分析(multi-analyte immunoassay, MIA),可以实现样品中多种农药的同步检测。

在当前农药杀虫剂品种中,有机磷杀虫剂仍然占有重要地位。这不仅在于它的防效优势及价格优势,而且其作用机制研究也较为清楚。但同时也应该看到,由于绝大多数有机磷杀虫剂属于中高毒品种,其在农产品中的残留超标问题就显得尤为严重。近年来,人们对有机磷农药的多残留免疫分析做了大量的工作,主要有以下几个思路。

## 1 混合抗体

混合抗体的方法要求首先制备出多种针对单一化合物的高特异性抗体,然后将这些抗体同时使用或以适当比例混合在一起检测多种分析物。例如Skerritt等<sup>[3]</sup>分别制备出甲基毒死蜱、杀螟硫磷及甲基嘧啶磷的多克隆抗体,同时用3种抗体可一次性测定谷物提取液中这3种有机磷的残留量;Garcés-García等<sup>[4]</sup>将毒死蜱、马拉硫磷、倍硫磷、二嗪农的抗体混合后建立了同时测定橄榄油中这几种农药的残留方法,检测限可达10~46 ng/mL,完全满足农药残留检

测的要求;吴雅欣<sup>[5]</sup>则采用毒死蜱和对硫磷包被抗原共同包被,封闭后同时将毒死蜱抗体、对硫磷抗体、毒死蜱与对硫磷梯度稀释液加入孔内进行竞争反应,测出两种农药的残留总量。混合包被法可同时测定多种农药单残留,也为农药多残留免疫分析提出了一条新思路。

## 2 多抗原决定簇抗体

在同一载体蛋白上偶联多个半抗原分子,合成多决定簇人工抗原或将多种人工抗原的混合物作为免疫原以制备抗体,机体同时针对这些抗原决定簇产生免疫应答反应,从而达到多组分检测的目的,该技术也称为复合免疫。例如,吴芸茹等<sup>[6]</sup>将根据甲基毒死蜱、甲基对硫磷和杀螟硫磷设计合成的人工抗原制成混合抗原进行复合免疫,获得的单克隆抗体对这3种杀虫剂都可以检出;Wang等<sup>[7]</sup>将毒死蜱、三唑磷、甲基对硫磷、克百威的4种半抗原依次偶联到载体蛋白上,免疫兔子后获得的多克隆抗体对这4种农药均具有较强特异性,可以同时检测这4种杀虫剂。复合免疫可以通过一个动物免疫或单次细胞融合一次性获得针对多种抗原表位的抗体,一方面节约了成本和时间,另一方面可以达到多残留检测的目的。

## 3 共性结构抗体(generic antibodies)

对于一类农药及其代谢物,往往具有相同的结构或部分相同的化学基团,如果设计合成的半抗原中含有这些共有特征,制备的抗体就可以识别与检测该类化合物或几种该类农药分子。近年来,根据农药分子的共性结构(common moiety),合成通用半抗原,制备广谱特异性抗体(broad specificity antibody, BsAb),借助抗体的交叉反应特性进行有机磷的多残留分析成为农药免疫分析的一大热点,而且抗体的交叉反应谱越宽,检测的成分就越多。有机磷农药的共有基团是磷酸酯,以此为核心进行衍生修饰,最终形成了一大类品种。根据磷酸酯键的类型可以将有机磷杀虫剂分为磷酸酯类 phosphate(图1 a)、膦酸酯类 phosphonate(图1 b)、一硫代磷酸酯类 thiophosphate、二硫代磷酸酯类 phosphorodithiolate(图1 c)和磷酰胺类 phosphoramidate(图1 f),一硫代磷酸酯类又可以分为硫逐磷酸酯 phosphorothionates(图1 d)和硫赶磷酸

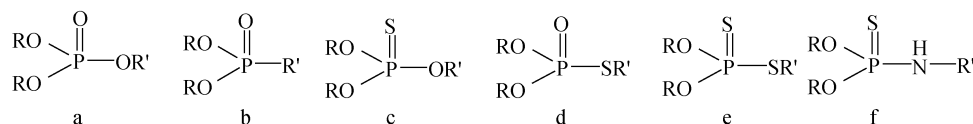


图 1 有机磷结构通式

Fig. 1 General structures of organophosphorus

酯 thiolo-phosphate(图 1 e)。国内外研究者基于共性结构抗体思路, 设计合成了多种有机磷农药通用半抗原, 用以探究有机磷农药多残留免疫分析的可行性。

### 3.1 磷酸酯类半抗原

二乙基磷酸乙酸(DPA)具有二乙基磷酸酯的骨架特征, 同时其羧基为载体蛋白的偶联提供了结构基础, 被认为是理想的有机磷半抗原。刘贤进等<sup>[8]</sup>与张丽杰等<sup>[9]</sup>采用 DPA 为半抗原, 制备的多克隆抗体可以测定毒死蜱、二嗪农、氧乐果、对硫磷、丙溴磷、辛硫磷等品种; Tang 等<sup>[10]</sup>以此半抗原获得的抗体除对上述农药品种外, 对啉啶磷、敌敌畏和敌百虫也有很好的检测能力; 但尹丽梅<sup>[11]</sup>以相同抗原产生的抗体只对啉啶磷和对氧磷表现一定的交叉反应率, 而对毒死蜱、二嗪农、对硫磷等没有识别作用。由此看来, 同一种半抗原产生的抗体的检测谱存在很大差异, 这应该跟载体蛋白的选择、半抗原在载体上的偶联数量及免疫方案等有很大关系。Alcocer 等<sup>[12]</sup>将 DPA 上的乙酸换成丁烯酸(即二乙基反式-4-磷酸-2-丁烯酸, TPB), 制备的多克隆抗体检测谱得到很大地扩展, 除对二嗪农、对硫磷外, 还可以检测对氧磷、苯胺硫磷、杀虫畏、马拉硫磷、甲基对氧磷、敌瘟磷、蚜灭多、胺丙畏、啉啶磷、速灭磷、百治磷、杀螟硫磷、久效磷、三硫磷、巴胺磷等十多种有机磷, 其中对杀螟畏和乙基对氧磷的检测限分别达到 0.3 ng/mL 和 0.6 ng/mL。对两种半抗原结构进行对比, 认为半抗原上的不饱和键具有一定的刚性结构, 使得化学键不易转动, 偶联蛋白后可以使特征基团更多地暴露, 从而有利于增强动物的免疫应答<sup>[13]</sup>。

### 3.2 硫逐式磷酸酯类半抗原

目前, 在有机磷杀虫剂中以硫代磷酸酯类的品种市场销售量最大。因此, 在近年来有关有机磷多残留免疫分析的研究和报道中, 绝大多数都是根据硫代磷酸酯类的共有基团进行半抗原的设计。Banks 等<sup>[14]</sup>根据甲氧基有机磷农药的结构特点设计相应通用半

抗原, 合成半抗原 *O,O*-二甲基-*O*-丁酸硫代磷酸酯, 是第一个用来制备抗体的直链硫逐磷酸酯类半抗原, 以此获得的多克隆抗体对含有类似结构的杀螟硫磷、虫螨畏、胺丙畏和敌敌畏有不同程度的识别能力。由于多种有机磷具有芳香取代的基团, 为了提高结构相似度, 在设计半抗原时往往被引入苯环。例如, Xu 等<sup>[15,16]</sup>以 *O,O*-二乙基-*O*-对苯甲酸硫代磷酸酯作为免疫半抗原, 没有通过直链连接臂, 而是直接以苯甲酸上的羧基将半抗原直接与蛋白偶联, 同时将半抗原换做间苯甲酸或苯酰胺的结构检测制备的多克隆抗体, 发现对多种含苯环或芳环硫代有机磷酸酯有很好的交互反应性, 尤其对蝇毒磷的检测限达到了 0.6 ng/mL。Piao 等<sup>[17]</sup>、薛小平等<sup>[18]</sup>、苏婧等<sup>[19]</sup>在 Xu 的基础上对苯甲酸进行了邻位或间位取代后免疫动物也都获得了广谱型抗体, 对对硫磷等二乙基芳香硫代磷酸酯同样具有很好的识别能力。Jang 等<sup>[20]</sup>又在苯环上引入氟原子与载体偶联后制备单克隆抗体, 再将氟换成甲基与载体偶联作为包被抗原进行筛选, 获得的抗体对溴硫磷、毒死蜱、甲基毒死蜱等有机磷农药的检测限达 10 ng/mL。Johnson 等<sup>[21]</sup>在苯环和载体蛋白间引入一段三个碳的桥链, 制备的多克隆抗体对毒死蜱、蝇毒磷、二嗪磷、乙拌磷、乙硫磷、对硫磷、伏杀硫磷、甲拌磷、谷硫磷、倍硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷等二乙基、二甲基硫代磷酸酯类杀虫剂都有很高的检出度, 尤其对对硫磷的最低检测限达到了 0.11 ng/mL; Liu 等<sup>[22]</sup>将上述半抗原的乙基改为甲基, 桥链换成两个碳后作为免疫半抗原, 同时对包被半抗原进行了较大的修饰, 用-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>COOH 换掉-OCH<sub>3</sub>, 甚至直接用-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH 置换了磷酸酯结构, 只保留了苯环的抗原表位, 制备的单克隆抗体对二甲氧基硫代磷酸酯类杀虫剂甲基对硫磷、甲基毒死蜱、甲基立枯磷、倍硫磷、马拉硫磷、杀螟硫磷的 IC<sub>50</sub> 值为 0.58~10.47 μg/mL; 李永祥等<sup>[23]</sup>分别在苯基硫代磷酸酯的苯环上引入丙烯酸和酰胺基, 与载体

偶联后进行免疫,分别获得相应的抗体,对异氰磷、杀螟腈、甲基对硫磷、杀螟硫磷、倍硫磷、皮蝇磷、甲基毒死蜱、伐灭磷等二甲基硫代磷酸酯都有很强的交叉反应;谢桂勉等<sup>[24]</sup>在李永祥的基础上将甲基改成乙基,对制备的抗体进行检测,蝇毒磷、对硫磷、三唑磷、甲拌磷、除线磷、辛硫磷等广泛使用的二乙基硫代磷酸酯类杀虫剂的 $IC_{50}$ 在0.013~1.301 ng/mL;为了探究同源包被(指包被原和免疫原的半抗原结构相同)与异源包被(指包被原和免疫原的半抗原结构不同)及半抗原与载体蛋白之间桥链的长短与抗体灵敏度的关系,两人对所获得的抗体进行同源和异源包被后进行组合试验,研究发现:异源包被的抗体检测灵敏度比同源包被要高,同时对几种半抗原刺激产生抗体的效果来看,短桥链半抗原与长桥链半抗原相比,更易刺激动物产生抗体,认为可能是抗原桥链较长时,容易发生弯曲,使构象发生变化,将目的抗原表位包裹或产生位阻效应而导致免疫效果下降。因此,采用异源包被要比增加桥链的长度更有利于提高抗体检测的灵敏度<sup>[25]</sup>;另外,当半抗原含有酰胺基团时,抗体虽然对半抗原的特异性很高,但对有机磷样品的检出能力明显低于不含酰胺基团的半抗原所产生的抗体,而且检测谱也窄,酰胺基团的引入可能对磷酸酯基团和苯环的骨架结构电子或空间取向影响较大,导致所获得的抗体对药物的竞争识别能力较差。Hoeve等<sup>[26]</sup>将2个P-O酯键固定在一个六元脂环烃上,避免了由于化学键转动引起的抗原表位隐藏或丧失,使硫代磷酸酯特征基团外露,更易刺激机体产生抗体,而且结果也表明抗体对供试的8种有机磷杀虫剂毒死蜱、对硫磷、二嗪农、对氧磷、谷硫磷、乐果、内吸磷、敌敌畏的检测范围都在纳克级。在设计半抗原时,许多人偏向于在农药分子骨架上引入羧基与载体蛋白的氨基残基偶联,韩丽君<sup>[27]</sup>通过在苯基硫代磷酸酯的苯环上引入氨基,与载体偶联后同样获得了抗体,对半抗原类似结构的杀螟硫磷、倍硫磷都可以很好地识别。

### 3.3 二硫代磷酸酯类半抗原

二硫代磷酸酯类也是有机磷杀虫剂中一个重要的类群,包括乐果、马拉硫磷、稻丰散、乙硫磷等许多优秀的品种。Liang等<sup>[28]</sup>针对该类群合成了半抗原,获得的多克隆抗体除对具有二硫代磷酸酯结构的马拉硫磷、乐果、稻丰散、亚胺硫磷有很强的识别能力

外,对杀扑磷、杀螟硫磷、甲基对硫磷、倍硫磷等硫逐磷酸酯也有一定的交叉反应。刘喜保等<sup>[29, 30]</sup>等合成了4种二硫代磷酸酯类和2种硫醇代磷酸酯类半抗原,获得9种多克隆抗体,其中*S*-羧甲基-*O,O*-二乙基二硫代磷酸酯与载体偶联抗原免疫产生的抗血清抗体效价达到 $1:2.56 \times 10^5$ ,对乙硫磷、亚胺硫磷、乐果、毒死蜱、氧化乐果、啶硫磷、倍硫磷、甲基嘧啶磷、敌百虫、辛硫磷都有一定的交叉反应,其中对硫逐磷酸酯类杀虫剂毒死蜱的灵敏度比对二硫代磷酸酯类的灵敏度还要高2~20倍。

### 3.4 磷酰胺类

以甲胺磷、乙酰甲胺磷为代表的磷酰胺类杀虫剂虽然品种不多,但其杀虫药效显著。其中甲胺磷由于其高毒性已经被禁用,促进了替代品种乙酰甲胺磷使用量的剧增,其残留问题也日益凸显。韩丽君<sup>[27]</sup>合成半抗原二甲氧基硫代磷酰胺,制备得到的多克隆抗体对乙酰甲胺磷、乐果、甲基对硫磷和马拉硫磷都表现了一定的交叉反应,其中乙酰甲胺磷的 $IC_{50}$ 为2.66  $\mu\text{g/mL}$ ,满足农药残留检测的标准。Hu等<sup>[31]</sup>以*O,O*-二乙基-*N*-(3-羧丙基)硫代磷酰胺为半抗原免疫兔子产生抗体,采用磁性微珠免疫吸附法检测后发现,抗体可以识别啶硫磷等多种对称有机磷,但对甲胺磷、乙酰甲胺磷的识别能力很差,说明半抗原上的二乙基硫代磷酸基团抗原表位的识别度要比磷酰基高。张敏<sup>[32]</sup>和唐建设<sup>[33]</sup>采用同样的半抗原获得的抗体只对与半抗原结构相似的直链二乙基磷酸酯杀虫剂甲拌磷、内吸磷、乙拌磷的亲合力较高,而与辛硫磷、啶硫磷、二嗪农、毒死蜱等含有芳环和杂环的结合性能较差。Wang等<sup>[34]</sup>合成了4种既含苯基硫代磷酸酯结构又具有磷酰胺结构的半抗原,获得的抗体对芳香类磷酸酯的对硫磷、甲基对硫磷和杀螟硫磷及磷酰胺类的水胺硫磷都有很好的识别作用。

## 4 单链可变区抗体

随着分子生物学技术的发展,作为第三代抗体的基因工程抗体又成为人们研究的热点。基因工程抗体就是通过基因重组技术将脾细胞表达的免疫球蛋白(IgG)重链(H链)和轻链(L链)的可变区(V区)通过一段连接肽连接成由连续基因表达的一条单链片段可变区(single-chain Fv, ScFv)抗体。ScFv不但保持了亲本抗体的抗原识别与结合特性,而且其分

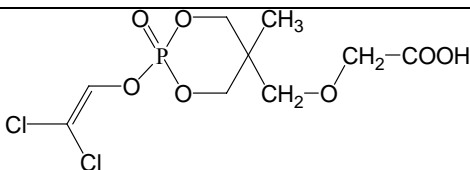
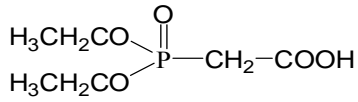
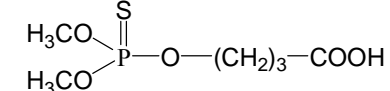
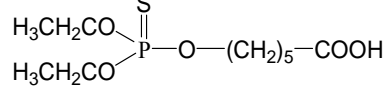
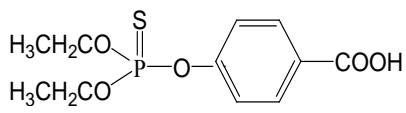
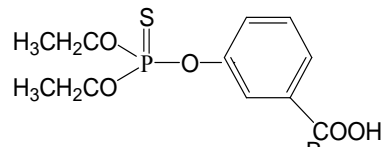
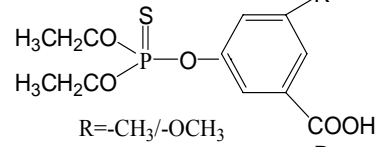
子量只有完整 IgG 的 1/6, 通过构建脾细胞的 cDNA 文库, 可以很容易地被转入各种载体(如细菌、质粒、酵母、噬菌体、昆虫细胞、植物细胞等)进行表达, 构成一个 ScFv 抗体库<sup>[35]</sup>。ScFv 抗体不通过细胞融合, 在文库扩增之前用抗原进行几轮筛选, 获得与抗原表位互相识别的噬菌体, 因此相对于单克隆抗体技术, 更容易获得具有高亲和力和高价价的抗体, 尤其在对低效价抗体的筛选方面具有很大的优越性。而且在抗体库筛选阶段, 用药物单体进行竞争结合试验, 筛选的抗体对游离态药物具有很高的亲和性。目前, 基因工程抗体的研究还主要集中于对人类疾病的免疫诊断治疗方面, 但这种技术很快就被应用于农药的免疫分析。Alcocer 等<sup>[36]</sup>先后从 2 株抗毒死蜱的杂交瘤细胞株中克隆到 2 个 ScFv 抗体基因序列, Li 等从小鼠脾细胞中克隆到 3 个抗甲胺磷的 ScFv 抗体基因<sup>[37]</sup>, 随后又将其转入到毕赤酵母中进行表达<sup>[38]</sup>。周丽君等<sup>[39]</sup>从抗二乙氧基硫代磷酸酯类有机磷农药单克隆抗体的杂交瘤细胞系中获取 ScFv 基因, 并构建成噬菌 ScFv 表达载体, 转化大肠杆菌进行表达, 与亲本单克隆抗体进行性能对比后发现, scFv 与二乙氧基硫代磷酸酯类的交叉反应率比其亲本提高了 1.3~3.5 倍。Garrett 等<sup>[40]</sup>从对硫磷单克隆抗体杂交瘤细胞株中克隆出抗体重链和轻链的可变区, 进行重组后获得 scFv 抗体, 与亲本单克隆抗体相比, 其稳定性和灵敏度都相当, 而且对甲基对硫磷和杀螟硫磷有一定的交叉反应。贺江等<sup>[41]</sup>以人源 scFv 抗体库为抗体源, 进行抗独特型抗体的筛选, 利用所筛选到的抗独特型抗体建立非竞争免疫检测技术, 筛选出 12 个阳性克隆, 利用抗独特型抗体建立的非竞争免

疫分析法对马拉硫磷的检出限达 10.5 ng/mL。这些研究结果说明采用单链可变区抗体技术完全可以满足农药分析的标准, 为农药残留检测提供了一条新的思路。

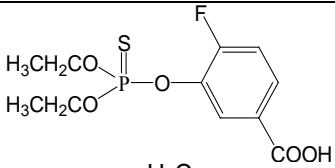
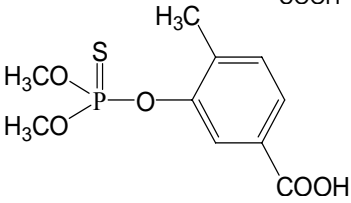
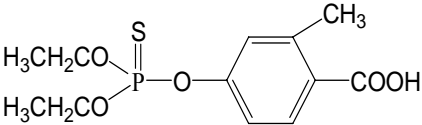
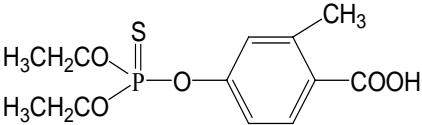
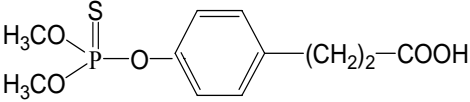
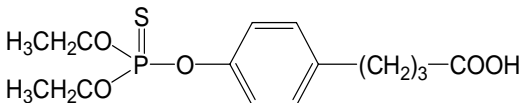
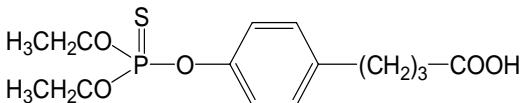
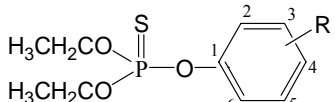
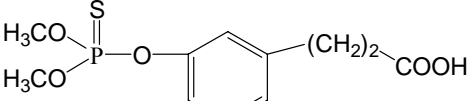
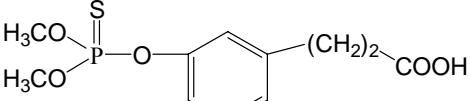
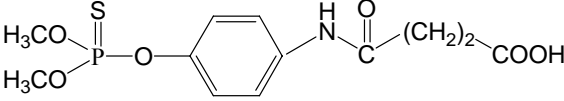
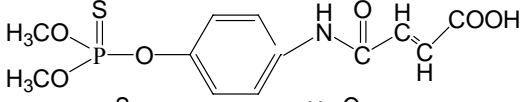
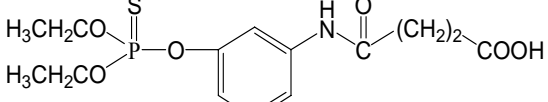
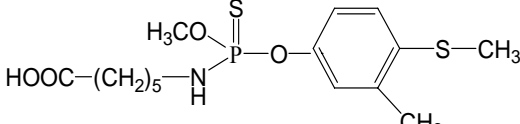
## 5 存在的问题与展望

从已报道的研究结果可以看出, 免疫分析技术可以进行农药多残留检测, 但仅限于对分析物明确的样品, 目前还很难达到对测试材料中未知样品检测的要求。以结构简单、代表性强的直链磷酸酯设计半抗原制备的抗体检测谱宽, 但由于分子结构太小导致抗原表位不能被机体有效识别, 抗体灵敏度差, 达不到残留检测的要求; 相反, 半抗原结构特异性越强, 抗体的灵敏度就越高, 但同时又造成检测谱过窄, 失去了多残留检测的意义。因此, 单纯通过任何一种方案, 都达不到预期的结果。如果将检测谱互补的抗体进行混合, 或将普通半抗原与特异性半抗原进行复合免疫, 就可以扬长避短, 获得较为满意的结果。其次, 从抗体性质和特性来看, 以多克隆抗体为主, 检测谱相对单克隆抗体较宽, 原因在于多克隆抗体实质上是一个针对不同抗原表位的抗体库。但多克隆抗体不能再生, 而且由于各种因素导致不同批次之间存在较大差异。近年来出现的 ScFv 抗体属于基因工程抗体, 可以通过表达载体大量表达, 而且不存在批次差异问题。如果将检测谱互补的 ScFv 基因进行重组, 表达二价甚至多价 ScFv 抗体, 进而建立相应的检测体系, 以满足多残留免疫检测的需求。随着现代生物技术向传统农药检测的逐渐渗透, 利用生物技术进行农药分析将成为人们探索的方向。

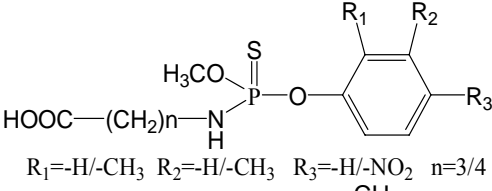
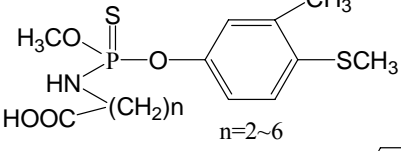
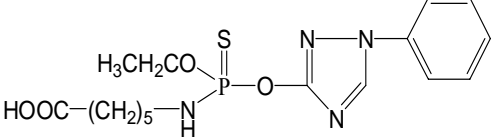
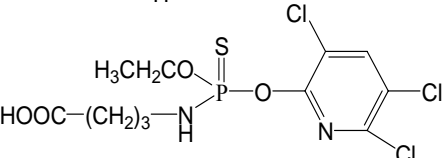
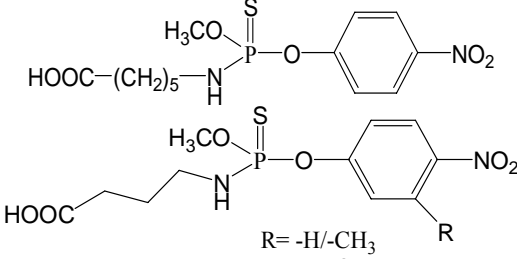
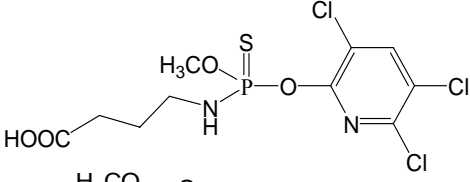
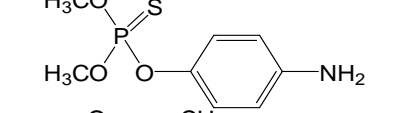
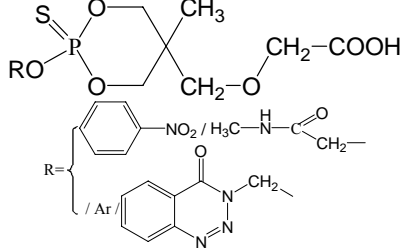
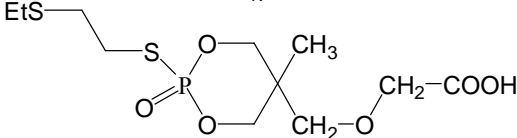
附录 有机磷杀虫剂半抗原的结构和类型  
Structures and types of organophosphorus insecticides

类型	半抗原结构	检测谱	文献
磷酸酯类		包被半抗原	[26]
		毒死蜱、氧乐果、二嗪农、乙基对硫磷、丙溴磷、辛硫磷	[8]
膦酸酯类		毒死蜱、对硫磷、丙溴磷、氧化乐果、除线磷、二嗪农、溴硫磷、辛硫磷、喹硫磷、三唑磷	[9]
		毒死蜱、二嗪农、氧乐果、对硫磷、丙溴磷、辛硫磷、噁啶磷、敌敌畏、敌百虫	[10]
		对氧磷、噁啶磷	[11]
		对毒死蜱、对氧磷、苯胺硫磷、杀虫畏、对硫磷、马拉硫磷、二嗪农、甲基对氧磷、敌瘟磷、蚜灭多、胺丙畏、噁啶磷、速灭磷、百治磷、杀螟硫磷、久效磷、三硫磷、巴胺磷	[12]
硫代磷酸酯类		杀螟硫磷、虫螨畏、胺丙畏、敌敌畏	[14]
		包被半抗原	[21]
		竞争半抗原	[17]
		对硫磷、蝇毒磷、喹硫磷、三唑磷、甲拌磷、除线磷、辛硫磷、二嗪农、氯唑磷	[15]
		对硫磷、蝇毒磷、除线磷、辛硫磷、喹硫磷、三唑磷、伏杀硫磷、甲拌磷、毒死蜱、溴硫磷、治螟磷、氯唑磷、二嗪农、噁啶磷	[16]
		竞争半抗原	[17]
		包被半抗原	[15]
	毒死蜱、二嗪农、对硫磷、噁啶磷、溴硫磷、除线磷、谷硫磷、伏杀硫磷、甲拌磷、乙拌磷、乙硫磷	[17]	

(续附录)

类型	半抗原结构	检测谱	文献
硫代磷酸酯类		溴硫磷、毒死蜱、除线磷、对硫磷、甲基溴硫磷、甲基毒死蜱、二嗪农、甲基对硫磷、谷硫磷	[20]
		竞争半抗原	[17]
		对硫磷、乙基溴硫磷、毒死蜱、甲基毒死蜱、除线磷、甲基对硫磷、溴硫磷、二嗪农	[18]
		毒死蜱、甲基对硫磷	[19]
		倍硫磷、甲基毒死蜱、甲基立枯磷、马拉硫磷、杀螟硫磷	[22]
		毒死蜱、蝇毒磷、二嗪农、乙拌磷、对硫磷、伏杀硫磷、甲拌磷、对氧磷、敌敌畏、谷硫磷、倍硫磷、马拉硫磷、甲基对硫磷	[21]
		未制备抗体	[42]
		蝇毒磷、对硫磷、喹硫磷、三唑磷、除线磷、辛硫磷及甲拌磷	[24]
	3、4位: $-\text{COOH}/-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}/$ $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{COOH}/$ $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$		
		异氯磷、杀螟腈、甲基对硫磷、杀螟硫磷、倍硫磷、皮蝇磷、甲基毒死蜱、伐灭磷、虫螨畏	
		异氯磷、杀螟腈、甲基对硫磷、杀螟硫磷、倍硫磷、皮蝇磷、甲基毒死蜱、溴硫磷、伐灭磷	[23]
		异氯磷、杀螟腈、甲基对硫磷、杀螟硫磷、倍硫磷、伐灭磷	
		异氯磷、杀螟腈、甲基对硫磷、杀螟硫磷、倍硫磷	
	包被半抗原	[23]	
	包被半抗原	[22]	

(续附录)

类型	半抗原结构	检测谱	文献
硫代磷酸酯类	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CO})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3)</math>  <math>\text{R}_1=-\text{H}/-\text{CH}_3</math> <math>\text{R}_2=-\text{H}/-\text{CH}_3</math> <math>\text{R}_3=-\text{H}/-\text{NO}_2</math> <math>n=3/4</math> </p>	对硫磷、甲基对硫磷、杀螟硫磷、水胺硫磷	[34]
	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CO})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3, \text{SCH}_3)</math>  <math>n=2\sim 6</math> </p>	考察连接臂对抗体的影响, 未测定样品	[25]
	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CH}_2\text{CO})-\text{O}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2-\text{C}_6\text{H}_5</math> </p>	混合抗原检测: 毒死蜱、三唑磷、甲基对硫磷	[7]
	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CH}_2\text{CO})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_2\text{N}(\text{Cl})_3</math> </p>	包被半抗原	[16]
	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CO})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2, \text{R})</math>  <math>\text{R}=-\text{H}/-\text{CH}_3</math> </p>	复合免疫抗体检测: 毒死蜱、对硫磷	[6]
	 <p> <math>\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CO})-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_2\text{N}(\text{Cl})_3</math> </p>	杀螟硫磷、倍硫磷	[27]
	 <p> <math>\text{H}_3\text{CO}-\text{P}(\text{S})(\text{H}_3\text{CO})-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2</math> </p>	毒死蜱、对硫磷、二嗪农、对氧磷、谷硫磷、乐果、内吸磷、敌敌畏	[26]
	 <p> <math>\text{RO}-\text{P}(\text{S})(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2), \text{CH}_3)-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}</math>  <math>\text{R}=\text{H}_3\text{C}-\text{N}(\text{H})-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-</math> / Ar         </p>		
	 <p> <math>\text{EtS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{P}(\text{O})(\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4(\text{NO}_2), \text{CH}_3)-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}</math> </p>		



(续附录)

类型	半抗原结构	检测谱	文献
		对硫磷、二嗪农、辛硫磷、三唑磷	[33]
二 硫 代 磷 酸 酯 类		未作竞争抑制	
		马拉硫磷、乐果、稻丰散、亚胺硫磷、杀扑磷、杀螟硫磷、甲基对硫磷、倍硫磷	[28]
		未作竞争抑制	
磷 酰 胺 类		毒死蜱、氧化乐果、啶硫磷、乙硫磷、倍硫磷、甲基嘧啶磷、敌百虫、亚胺硫磷、辛硫磷、乐果	[29]
	$R = -CH_2CH_3 / -CH_3$ $X = O / S$ $n = 1 / 2$		
		乙酰甲胺磷、乐果、甲基对硫磷、马拉硫磷	[27]
		包被半抗原	[23]
非 磷 酸 酯 类		啶硫磷、毒死蜱、对硫磷、甲拌磷、三唑磷、伏杀硫磷、甲基对硫磷、马拉硫磷、倍硫磷、敌百虫、敌敌畏、久效磷	[31]
		甲拌磷、内吸磷、乙拌磷	[32]
		内吸磷、甲拌磷和乙拌磷	[33]
		包被半抗原	[22]

## 参考文献

- [1] Walorczyk S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1165: 200-212.
- [2] 赵肃清, 蔡燕飞, 李军, 等. 单克隆抗体在农药残留检测中的应用[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(3): 96-98.  
Zhao SQ, Cai YF, Li J, *et al.* Utilization of monoclonal antibodies for pesticides residue determination [J]. *Immunol J*, 2005, 21(3): 96-98.
- [3] Skerritt JH, Hill AS, Beasley HL, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of organophosphate pesticides: Fenitrothion, chlorpyrifos-methyl, and pirimiphos-methyl in wheat grain and flour-milling fractions [J]. *J AOAC Int*, 1992, 75: 519-528.
- [4] Garcés-García M, Brun EM, Puchades R, *et al.* Immunochemical determination of four organophosphorus insecticide residues in olive oil using a rapid extraction process [J]. *Anal Chem Acta*, 2006, 556: 347-354.
- [5] 吴雅欣. 有机磷农药多残留 ELISA 方法探讨[D]. 中国农业科学院, 2009.  
Wu YX. Preliminary study on enzyme-linked immunosorbent assay for multi-residue detection of organic phosphorus pesticides [D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.

- [6] 吴芸茹, 王利民, 娄旻, 等. 复合免疫制备3种有机磷农药单克隆抗体的技术研究[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(4): 94-99.  
Wu YR, Wang LM, Lou Y, *et al.* Preparation of organophosphorus pesticide monoclonal antibodies against multiple antigens [J]. J Nanjing Agr Univ, 2009, 32(4): 94-99.
- [7] Wang ST, Gui WJ, Guo YR, *et al.* Preparation of a multi hapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay[J]. Anal Chim Acta, 2007, 587: 287-292.
- [8] 刘贤进, 颜春荣, 刘媛, 等. 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[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 727-733.  
Liu XJ, Yan CR, Liu Y, *et al.* Use of generic hapten in production of broad specificity anti-organophosphorous pesticides antibody [J]. Sci Agr Sin, 2008, 41(3): 727-733.
- [9] 张丽杰, 潘家荣. 乙氧基磷酸酯类有机磷农药单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 生物化学与生物物理进展, 2010, 37(9): 1016-1024.  
Zhang LJ, Pan JR. Preparation and identification of a monoclonal antibody specific to a broad spectrum of O, O-diethyl organophosphorus pesticides [J]. Prog Biochem Biophys, 2010, 37(9): 1016-1024.
- [10] Tang JS, Zhang M, Cheng GH, *et al.* Development of IC-ELISA for detection of organophosphorus pesticides in water [J]. J Environ Sci Health B, 2008, 43: 707-712.
- [11] 尹丽梅. 有机磷农药多残留免疫分析方法的研究[D]. 江南大学, 2009.  
Yin LM. Study on the multi-residue immunoassay of Organophosphorus pesticides[D]. Jiangnan University, 2009.
- [12] Alcocer MJC, Dillon PP, Manning BM, *et al.* Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody[J]. J Agr Food Chem, 2000, 48: 2228-2233.
- [13] Shen YD, Zhang SW, Lei HT, *et al.* Design and synthesis of immunoconjugates and development of an indirect ELISA for rapid detection of 3, 5-dinitrosalicylic acid hydrazide [J]. Molecules, 2008, 13: 2238-2248.
- [14] Banks J N, Chaudhry M Q, Matthews W A, *et al.* Production and characterisation of polyclonal antibodies to the common moiety of some organophosphorous pesticides and development of a generic type ELISA[J]. Food Agr Immunol, 1998, 10: 349-361.
- [15] Xu ZL, Shen YD, Zheng WX, *et al.* Broad-specificity immunoassay for O, O-Diethyl organophosphorus pesticides: application of molecular modeling to improve assay sensitivity and study antibody recognition[J]. Anal Chem, 2010, 82: 9314-9321.
- [16] Xu ZL, Xie GM, Li YX, *et al.* Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O,O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structureactivity relationship study of antibody recognition[J]. Anal Chem Acta, 2009, 647: 90-96.
- [17] Piao YZ, Kim YJ, Kim YA, *et al.* Development of ELISAs for the class-specific determination of organophosphorus pesticides [J]. J Agr Food Chem, 2009, 57(21): 10004-10013.
- [18] 薛小平, 张美顺, 李荣源, 等. 高亲和力抗有机磷杀虫剂单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 68-71.  
Xue XP, Jang MS, Lee WY, *et al.* Identification and characterization of high affinity monoclonal antibodies against organophosphorous pesticides[J]. China Biotechnol, 2003, 23(6): 68-71.
- [19] 苏婧, 薛小平, 唐蕊华, 等. 一种有机磷农药单克隆抗体的制备及其特性研究[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(4): 21-22.  
Su J, Xue XP, Tang RH, *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies for analysis of organophosphorus pesticides[J]. Environ Pollut Contr, 2008, 30(4): 21-22.
- [20] Jang MS, Lee SJ, Xue XP, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to a generic hapten for class-specific determination of organophosphorus pesticides[J]. Bull Chem Soc, 2002, 23(8): 1116-1120.
- [21] Johnson JC, Van EJM, Pullman DR, *et al.* Development and evaluation of antisera for detection of the O,O-diethyl phosphorothionate and phosphorothiothiolate organophosphorus pesticides by immunoassay[J]. J Agr Food Chem, 1998, 46(8): 3116-3123.
- [22] Liu Y, Lou Y, Xu D, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibody for class-specific determination of O, O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of heterologous coating antigens on immunoassay sensitivity[J]. Microchem J, 2009, 93: 36-43.
- [23] 李永祥, 徐振林, 王弘, 等. 二甲氧基硫代磷酸酯类农药多残留免疫分析方法研究[J]. 分析化学, 2010, 38(11): 1550-1555.  
Li YX, Xu ZL, Wang H, *et al.* Development of broad-specificity immunoassay for detection of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides[J]. Chin J Anal Chem, 2010, 38(11): 1550-1555.
- [24] 谢桂勉, 孙远明, 徐振林, 等. 硫代磷酸二乙酯类农药半抗原设计及抗体识别特性[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(11): 2193-2198.  
Xie GM, Sun YM, Xu ZL, *et al.* Design of generic Haptens for O, O-diethyl phosphorothioate pesticides and recognition properties of antibodies[J]. Chem J Chin Univ, 2009, 30(11): 2193-2198.
- [25] Kim YJ, Cho YA, Lee HS, *et al.* Hammocke Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity[J]. Anal Chim Acta, 2003, 475: 85-96.

- [26] Hoeve W, Wynberg H, Jones WT, *et al.* Syntheses of haptens containing dioxaphosphorinan methoxyacetic acid linker arms for the production of antibodies to organophosphate pesticide[J]. *Bioconj Chem*, 1997, 8(3): 257–266.
- [27] 韩丽君. 有机磷农药的酶免疫化学研究[D]. 中国农业大学, 2003.  
Han LJ. Study on Enzyme Immunochemistry of Organic Phosphorus Pesticides[D]. China Agricultural University, 2003.
- [28] Liang Y, Liu XJ, Liu Y, *et al.* Synthesis of three haptens for the class-specific immunoassay of O, O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 615: 174–183.
- [29] 刘喜保. 有机磷多残留免疫检测分析研究[D]. 西北农林科技大学, 2012.  
Liu XB. Study of multi-residue immunoassay for organophosphorus pesticides [D]. Northwest A&F University, 2012.
- [30] 刘喜保, 温万东, 祁志军, 等. 硫代磷酸酯类农药通用抗原的合成与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 95–101.  
Liu XB, Wen WD, Qi ZJ, *et al.* Synthesis and identification of generic antigen for phosphorothioate pesticides[J]. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 2012, 40(4): 95–101.
- [31] Hu Y, Shen GQ, Zhu HL, *et al.* A class-specific enzyme-linked immunosorbent assay based on magnetic particles for multiresidue organophosphorus pesticides[J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58: 2801–2806.
- [32] 张敏. 有机磷农药多残留酶联免疫吸附分析方法的研究[D]. 上海交通大学, 2009.  
Zhang M. Study of multi-residue ELISA for organophosphorus pesticides [D]. Shanghai Jiaotong University, 2009.
- [33] 唐建设. 有机磷农药荧光偏振及多残留分析研究[D]. 上海交通大学, 2008.  
Tang JS. Study on fluorescence polarization immunoassay and multi-residue ELISA for organophosphorus pesticides [D]. Shanghai Jiaotong University, 2008.
- [34] Wang CM, Li XB, Liu YH, *et al.* Development of a mab-based heterologous immunoassay for the broad-selective determination of organophosphorus pesticides[J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58 (9): 5658–663.
- [35] Yau KYF, Lee H, Hall JC. Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies[J]. *Biotechnol Adv*, 2003, 21: 599–637.
- [36] Alcocer MJC, Doyen C, Lee HA, *et al.* Functional ScFv Antibody Sequences against the Organo-phosphorus Pesticide Chlorpyrifos[J]. *J Agr Food Chem*, 2000, 48: 335–337.
- [37] Li TJ, Zhang Q, Liu Y, *et al.* Production of recombinant ScFv antibodies against methamidophos from a phage-display library of a hyperimmunized mouse[J]. *J Agr Food Chem*, 2006, 54: 9085–9091.
- [38] Li TJ, Cheng JR, Hu BS, *et al.* Construction, production, and characterization of recombinant ScFv antibodies against methamidophos expressed in *Pichia pastoris* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24: 867–874.
- [39] 周丽君, 黄启欣, 雷红涛, 等. 二乙氧基硫代磷酸酯类有机磷农药单链抗体的制备及广谱特异性[J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(10): 2269–2274.  
Zhou LJ, Huang QX, Lei HT, *et al.* Preparation of a single-chain variable fragment for O, O-diethyl phosphorothioate pesticides and its broad-specificity[J]. *Chem J Chin Univ*, 2012, 33(10): 2269–2274.
- [40] Garrett SD, DJA, Wyatt GM, *et al.* Production of a recombinant anti-parathion antibody (ScFv); Stability in methanolic food extracts and comparison to an anti-parathion monoclonal antibody [J]. *J Agr Food Chem*, 1997, 45: 4183–4189.
- [41] 贺江, 梁颖, 樊明涛, 等. 噬菌体展示技术制备甲氧基有机磷农药抗独特型抗体[J]. 分析化学, 2011, 39(2): 178–182.  
He J, Liang Y, Fan MT, *et al.* Preparation of anti-idiotypic antibodies of O, O-dimethyl organophosphorus pesticides by phage display technology [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(2): 178–182.
- [42] 陈林, 吴青, 郑晓冰. 半抗原: O,O-二乙基,O-[对-(4-羧基丁基)苯基]硫代磷酸酯的合成[J]. 农药, 2006, 45(4): 243–245.  
Chen L, Wu Q, Zheng XB. Synthesis of the hapten O, O-diethyl, O-[p-(4-carboxybutyl) phenyl] phosphorothionate[J]. *Agrochemicals*, 2006, 45(4): 243–245.

(责任编辑: 赵静)

## 作者简介



祁志军, 副教授, 主要研究方向为新农药研究与开发及农药免疫分析。

E-mail: qzhij@nwsuaf.edu.cn