

溴氰菊酯残留酶联免疫分析方法的建立

张 婧, 魏朝俊, 王春娜, 王 静, 赵建庄

(北京农学院, 北京 102206)

摘 要:在前期设计合成了溴氰菊酯半抗原(DM)和人工抗原(DM-BSA 和 DM-OVA)的基础上,进一步利用人工抗原(DM-BSA)免疫新西兰大白兔获得了溴氰菊酯多克隆抗体。研究表明,新西兰大白兔产生的抗体对溴氰菊酯产生了灵敏的特异性免疫反应,所得多克隆抗体的效价为 25 600。以 DM-OVA 为包被原建立溴氰菊酯间接竞争 ELISA 检测方法,确定了抗原抗体最适工作浓度均为 1:12 800。在含 10%甲醇、pH 7.4、盐浓度 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的缓冲液条件下制作了溴氰菊酯的标准抑制曲线,抑制中浓度 IC_{50} 为 $3.999 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,检出限 IC_{10} 为 $0.023 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测范围为 $0.015 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。抗体对包括氯菊酯、氰菊酯、甲氰菊酯在内的 8 种菊酯类农药的交叉反应率较低,在苹果中的添加回收率为 86.2%~105.8%。成功制备出溴氰菊酯特异性抗体,并建立了水果中溴氰菊酯残留间接竞争酶联免疫分析方法。

关键词:溴氰菊酯;多克隆抗体;ELISA

中图分类号:X830.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)05-1065-05

Development of Enzyme Immunoassays for Deltamethrin

ZHANG Jing, WEI Chao-jun, WANG Chun-na, WANG Jing, ZHAO Jian-zhuang

(Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: On the base of preliminary studies, including the synthesis of hapten (DM) and the preparation of artificial antigen (DM-BSA, DM-OVA), polyclonal antibody against deltamethrin was successfully obtained by immunization of New Zealand white rabbits with DM-BSA. The highest titer of the antiserum was 25 600. As coating antigen, DM-OVA was used to establish an indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay (IC-ELISA) for deltamethrin. The dilution of the coating antigen and the antibody used in the ELISA were 1:12 800. Furthermore, the buffer solution used in ELISA with 10 % methanol, pH 7.4, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl were also determined. The results indicated that the antibody produced from New Zealand white rabbits immunized had high affinity to deltamethrin tested by IC-ELISA, the IC_{50} for deltamethrin was $3.999 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the lowest detection limit IC_{10} was $0.023 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, the working range was assigned to concentrations $0.015 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for deltamethrin. Different cross-reactions with the closely related to deltamethrin, including cypermethrin, permethrin, lambda-cyhalothrin, fenprothrin, bio-allethrin, tetramethrin, fenvalerate, emperthrin, were observed. There were low cross reactivities. Recovery rate of deltamethrin spiked to apple was 86.2%~105.8%. Special antibody was produced successfully and IC-ELISA was developed for the analysis of deltamethrin residue in fruits.

Keywords: deltamethrin; polyclonal antibody; ELISA

拟除虫菊酯(Pyrethroid)作为一类广谱性杀虫剂,被广泛应用于农业、林业、公共卫生等^[1],但它的高频

次使用破坏了生态平衡,使得该类农药在环境及其农副产品中的残留水平较高,直接或间接危及到了人类的健康,阻碍了中国农副产品正常的出口贸易活动^[2]。

溴氰菊酯(Deltamethrin)是我国用量最大的拟除虫菊酯类农药,目前溴氰菊酯残留的检测常采用气相色谱法(GC)^[3-4]和高效液相色谱法(HPLC)^[5],但是这些方法所需的仪器昂贵,样品前处理过程复杂,难以满足大批量样品的快速检测需要。免疫分析方法具有特异性强、分析容量大、分析费用低、仪器化程度不高、方便快捷等优点,近年已被广泛应用于农药残留

收稿日期:2008-10-20

基金项目:北京市自然科学基金(6052004);北京市教委资助项目(KM200610020010);农产品加工及贮藏工程北京市重点建设学科(PXM2009-014207-078172);北京主要农用投入品检测技术研究与应用(Z090605006 00906);北京市属市管高校人才强教计划(PXM2007-014207-044536)

作者简介:张 婧(1984—),女,山西长治人,硕士研究生,主要从事农药残留检测方向的研究。E-mail:jingdong8487@163.com

通讯作者:赵建庄 E-mail:zhaojianzhuang@263.net

检测^[6-7]。李波等^[8],刘廷凤等^[9]对菊酯类农药的免疫检测方法做了一些研究,但针对溴氰菊酯的免疫分析研究还未见报道,针对该农药的快速检测试剂盒市场上也未见销售^[10-11]。

多克隆抗体的制备是一个复杂的过程,为制备高效价和高特异性的多克隆抗体,必须要有理想的免疫原、适宜的动物及切实可行的免疫方法。另外,抗原抗体结合反应受很多外界因素的影响,因此,选择适合的 ELISA 检测条件也是建立农药快速免疫分析技术的关键所在。本研究在前期设计合成了溴氰菊酯半抗原和人工抗原^[12-13]的基础上,进一步制备出溴氰菊酯多克隆抗体,建立了溴氰菊酯间接竞争 ELISA 检测方法,为快速检测试剂盒的研制打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新西兰大白兔,溴氰菊酯人工抗原(DM-BSA 和 DM-OVA,实验室合成),弗氏完全佐剂(美国, Sigma),弗氏不完全佐剂(美国, Sigma),辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,进口分装),96 孔酶标板(美国, Costar),科通 303-AO 型台式培养箱(浙江科通仪器有限公司),Model 680 型酶标仪(美国, Bio-Rad),KQ-600 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

间接 ELISA 测定所需试剂的配制:

磷酸盐缓冲液(PBS):40.0 g NaCl,1.0 g KCl,1.0 g KH_2PO_4 ,14.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,溶于 5.0 L 去离子水中,pH7.4;

包被缓冲液:0.50 g Na_2CO_3 ,1.46 g NaHCO_3 ,溶于 500 mL 蒸馏水中,pH9.6;

样品稀释液:1.0 L PBS 加 1.0 mL Tween-20 和 1 g 明胶;

底物缓冲液:2.55 g 柠檬酸,9.22 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 500.0 mL 蒸馏水中,再加 0.5 mL Tween-20;

洗涤液:1.0 L PBS 加 1.0 mL Tween-20;

终止液:2 mol·L⁻¹ H_2SO_4 ;

提取剂: $V_{\text{正己烷}}:V_{\text{乙酸乙酯}}=80:20$ 。

1.2 溴氰菊酯多克隆抗体的制备

选 3 只健康的 4 月龄雄性新西兰大白兔,在免疫试验进行前采集阴性血清备用。基础免疫时,将 DM-BSA 与弗氏完全佐剂等体积混合,背部皮内多点注

射,免疫剂量为 0.8~1.0 mg·kg⁻¹(免疫原/兔重);加强免疫用弗氏不完全佐剂,背部皮下多点注射,免疫剂量为 1.0~1.2 mg·kg⁻¹,每次免疫间隔 14 d^[14]。四免后,耳缘静脉采血间接 ELISA 法测定抗血清效价^[15],达到 2×10^4 后,心脏采全血,分离抗血清,-20℃冻存,备用。

1.3 溴氰菊酯间接竞争 ELISA 法的建立

1.3.1 抗原抗体最适工作浓度的选择

选择高效价的抗血清,用方阵滴定法^[13]确定抗原抗体最适工作浓度。当 OD 值为 1 左右且抗原抗血清用量较少时,包被原和抗血清的浓度即为抗原抗体最适工作浓度^[16]。

1.3.2 有机溶剂的选择

在样品稀释液中分别添加 DMSO 和甲醇,使之终浓度为 10%、20%、30%、40%、50%,溴氰菊酯浓度设置为 0、0.015、0.045、0.137、0.412、1.235、3.704、11.111、33.333、100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在上述已确定的 ELISA 反应条件下,考察有机溶剂对抗体和 IC₅₀ 的影响,确定最佳有机溶剂。

1.3.3 pH 值的选择

将样品稀释液的 pH 值分别调为 3、5、7.4、9、11,溴氰菊酯浓度设置同上,考察 pH 值对抗体和 IC₅₀ 的影响。

1.3.4 盐浓度的选择

改变样品稀释液中 NaCl 的浓度,使之成为 0.1、0.2、0.3、0.4 mol·L⁻¹,溴氰菊酯的浓度设置同上,考察盐浓度对抗体和 IC₅₀ 的影响。

1.3.5 选定条件的综合测试

将上述确定的抗原抗体浓度、有机溶剂、pH 值等条件进行综合试验,溴氰菊酯浓度设置同上,以抑制率 *I*% 为纵坐标,以浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,并求 IC₅₀ 和 IC₁₀₀。

$$I\% = (\text{OD}_{\text{空白对照}} - \text{OD}_{\text{待测样品}}) / \text{OD}_{\text{空白对照}} \times 100\%$$

1.4 抗血清交叉反应的测定

选择溴氰菊酯、氯菊酯、氯氰菊酯、生物丙烯菊酯、胺菊酯、炔戊菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯、高效氯氰菊酯 9 种菊酯类农药进行抗血清交叉反应的测定,浓度设置同 1.3.5。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \text{IC}_{50} \text{ 溴氰菊酯} / \text{IC}_{50} \text{ 结构类似物} \times 100\%$$

1.5 溴氰菊酯在苹果中添加回收率试验

称取苹果匀浆 20.0 g,加入 30.0 mL 提取剂和 30.0 g 无水 Na_2SO_4 ,超声提取 30 min。过滤,滤液 40℃下浓缩至干,最后用含 10%甲醇,pH7.4,盐浓度 0.1

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的样品稀释液定容至 2.0 mL, 过滤, 滤液供 ELISA 测定。

将溴氰菊酯标样添加于苹果匀浆中, 使之终浓度为 0.0、0.1、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 按上述方法提取进行样品添加回收试验, 计算添加回收率及变异系数。

2 结果与分析

2.1 抗血清免疫学评价

用间接 ELISA 法测定 3 只兔子的抗血清效价, 分别为 25 600、12 800 和 6 400, 选择高效价的抗血清为进一步试验对象。

方阵滴定法确定抗原抗体最适工作浓度(表 1)。结果表明, 随着抗原抗体浓度的降低, OD 值也逐渐减小, 根据 OD 值接近 1 的原则, 确定抗原抗体工作浓度均为 1:12 800。

2.2 有机溶剂、pH 值和盐浓度对 ELISA 的影响

按 1.3.2、1.3.3、1.3.4 所述方法考察有机溶剂、pH 值和盐浓度对 ELISA 的影响(图 1~图 3, 表 2)。

由图表可知, DMSO 对抗体影响较大, 而甲醇浓度则与其相应的 OD 值呈正相关, 浓度越大, OD 值越高, 对抗体的影响也越大。另外, OD 值随着 pH 值的增大而逐渐升高, 但却随着盐浓度的增大而大大下降。依据 OD 值为 1 左右, IC_{50} 相对较小的原则, 本试验选择在 10% 甲醇、pH 7.4、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度的反应条件下做进一步研究。

2.3 溴氰菊酯标准抑制曲线的建立

将上述确定的 ELISA 检测条件进行综合测试, 即抗原和抗体 12 800 倍稀释, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 1 000 倍稀释, 样品稀释液含 10% 甲醇, pH 7.4, 盐浓度为 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。溴氰菊酯浓度设置为 0、0.015、

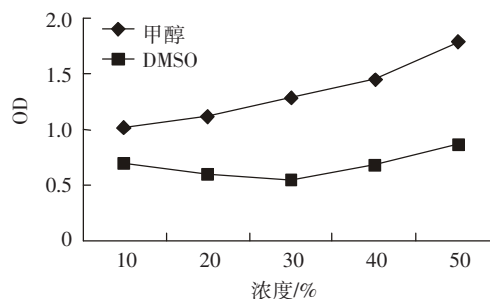


图 1 不同有机溶剂对抗体的影响

Figure 1 Effect of organic solvents on the antibody

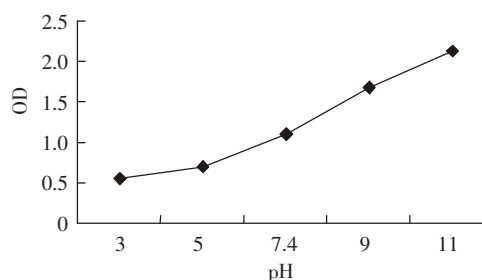


图 2 不同 pH 值对抗体的影响

Figure 2 Effect of different pH on the antibody

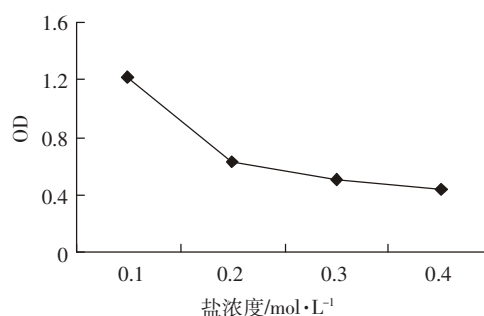


图 3 不同盐浓度对抗体的影响

Figure 3 Effect of salt with different concentration on the antibody

表 1 不同浓度抗原和抗体对 OD 值的影响

Table 1 Effect of antigen and antibody with different concentration on OD

抗体稀释度	OD									
	1 600		6 400		12 800		25 600		51 200	
抗原稀释度	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1 600	3.500	0.105	3.092	0.103	1.392	0.033	0.811	0.022	0.558	0.033
3 200	3.500	0.114	2.553	0.069	1.296	0.046	0.842	0.018	0.436	0.020
6 400	3.360	0.094	2.187	0.077	1.109	0.055	0.685	0.023	0.308	0.025
12 800	3.152	0.121	1.898	0.053	1.024	0.041	0.580	0.013	0.291	0.020
25 600	3.166	0.139	1.684	0.137	0.825	0.058	0.596	0.018	0.283	0.016
51 200	3.088	0.247	1.412	0.229	0.721	0.057	0.586	0.033	0.284	0.036

注: + 为阳性血清; - 为阴性血清。

Note: + positive serum; - negative serum.

0.045、0.137、0.412、1.235、3.704、11.111、33.333、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,以抑制率 $I\%$ 为纵坐标,以浓度的对数为横坐标绘制标准曲线(图4),得线性方程: $y=0.18x-0.148\ 3$ ($R^2=0.984\ 8$), $\text{IC}_{50}=3.999\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{IC}_{10}=0.023\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

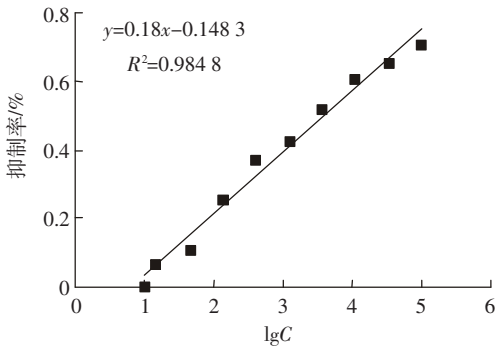


图4 溴氰菊酯标准抑制曲线

Figure 4 Inhibition curves of deltamethrin reaction

表2 不同反应条件对 IC_{50} 的影响

Table 2 Effect of different conditions on IC_{50}

pH	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	甲醇浓度/ %	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	盐浓度/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
3	>50	10	4.535	0.1	4.125
5	30.254	20	3.756	0.2	4.134
7.4	4.035	30	7.241	0.3	>50
9	7.254	40	13.512	0.4	>50
11	10.214				

2.4 抗体特异性分析

选择多种菊酯类农药考察抗体的特异性(表3)。结果表明,抗体对氯氰菊酯有一定的交叉反应,达到14.3%,对氯菊酯、高效氯氟氰菊酯、甲氰菊酯、生物丙烯菊酯、胺菊酯、氰戊菊酯、炔戊菊酯几乎没有交叉反应,这与农药的分子结构有关系。

2.5 苹果中溴氰菊酯的添加回收试验

按1.5所述方法进行添加回收试验(表4)。结果表明,溴氰菊酯在苹果试样中的添加回收率为86.2%~105.8%,变异系数为6.0%~9.8%,基本符合农药残留分析的要求。

3 讨论

3.1 溴氰菊酯间接竞争 ELISA 检测方法的建立

影响 ELISA 灵敏度的因素很多。本试验选择 pH 为7.4,盐浓度为 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的缓冲液参与反应,诸多研究^[9,14-15]也表明,在中性和低离子浓度条件下,抗原抗体结合反应的灵敏度较高。另外,溴氰菊酯为亲酯性化合物,水中溶解度极低,这不利于以水溶液为介

表3 抗体对溴氰菊酯结构类似物的交叉反应

Table 3 Cross-reactivates with compounds structurally related to deltamethrin

农药	$\text{IC}_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	交叉反应率/%
溴氰菊酯	4.715	100
氯氰菊酯	33.015	14.3
氯菊酯	>100	<5
高效氯氟氰菊酯	>100	<5
甲氰菊酯	>100	<5
生物丙烯菊酯	>100	<5
胺菊酯	>100	<5
氰戊菊酯	>100	<5
炔戊菊酯	>100	<5

表4 苹果中溴氰菊酯加标回收率($n=5$)

Table 4 Recovery rates of deltamethrin spiked to apple($n=5$)

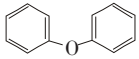
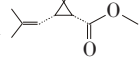
添加浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	回收率/%	变异系数/%
0.1	105.8 ± 6.3	6.0
0.5	91.8 ± 3.3	9.8
1.0	86.2 ± 7.4	8.6

质的 ELISA 反应。为了促进溴氰菊酯的溶解性,在标准品稀释液中添加一定浓度的有机溶剂是非常必要的。本试验选取常用的甲醇和 DMSO 作为研究对象,发现甲醇对抗体的影响较小,但是,高浓度的甲醇会增加背景反应,不利于检测结果,这与李波等^[17]的研究结果一致,本试验确定甲醇含量为10%。

在已确定的试验条件下,建立了溴氰菊酯标准曲线,在 $0.015\sim100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,线性良好, IC_{50} 为 $3.999\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, IC_{10} 为 $0.023\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,并以苹果为试样,进行了溴氰菊酯添加回收试验,回收率为86.2%~105.8%。本研究建立的方法基本满足了农药残留分析的要求,但在检测条件方面还有待优化改善。

3.2 抗体的特异性

考察所得溴氰菊酯多克隆抗体的特异性,发现该抗体对氯氰菊酯有一定的交叉反应,对氯菊酯、高效氯氟氰菊酯、甲氰菊酯、生物丙烯菊酯、胺菊酯、氰戊菊酯、炔戊菊酯几乎没有交叉反应,分析其原因发现氯氰菊酯与溴氰菊酯的空间结构非常相似,除含有上

述菊酯类农药共有结构  和  外,两者都含有 $-\text{CN}$ 和 $-\text{X}(\text{Cl}, \text{Br})$,说明这4个结构是溴氰菊酯的免疫决定区,骆爱兰等^[18]也正是在对这些菊酯类农药共有结构修饰的基础上建立了菊酯类农药多残留酶免疫分析法。

4 结论

本文报道了溴氰菊酯多克隆抗体的制备方法,并在对抗体进行初步评价的基础上,建立了水果中溴氰菊酯间接竞争 ELISA 检测方法。结果表明,该方法基本上符合农药残留分析的要求,可应用于水果中溴氰菊酯残留物的测定,为溴氰菊酯免疫分析的深入研究及其快速检测试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] 马建华. 拟除虫菊酯类杀虫剂的特点及使用[J]. 河北林业, 2004(2): 37.
MA Jian-hua. The characteristics and the use of pyrethroid insecticides [J]. *Hebei Forestry*, 2004(2): 37.
- [2] 郑伟华, 赵建庄, 马德英, 等. 溴氰菊酯的毒性和致突变性的研究进展[J]. 北京农学院学报, 2004, 19(1): 77-80.
ZHENG Wei-hua, ZHAO Jian-zhuang, MA De-ying, et al. Development of deltamethrin toxicity and mutagenicity[J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2004, 19 (1): 77-80.
- [3] 吴加伦, 邹耀华, 李丽青. 白芍和黄连中十五种有机氯和拟除虫菊酯类农药的多残留分析方法[J]. 农药学学报, 2006, 8(1): 65-70.
WU Jia-lun, ZOU Yao-hua, LI Li-qing. Multi-residue analysis of fifteen organochlorine and pyrethroid insecticides in *Raidix paeoniae Alba* and *Rhizoma coptidis*[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2006, 8 (1): 65-70.
- [4] 吴志华, 邹雅竹, 龚道新, 等. 饲料中拟除虫菊酯类农药的多残留分析技术[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(1): 77-80.
WU Zhi-hua, ZOU Ya-zhu, GONG Dao-xin, et al. Multi-residue determination of pyrethrum ester pesticides in feed[J]. *Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences)*, 2006, 32 (1): 77-80.
- [5] 林子庵, 龚巧燕, 谢增鸿. 高效液相色谱测定蔬菜中拟除虫菊酯类农药残留[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2008, 36(1): 122-125.
LIN Zi-an, GONG Qiao-yan, XIE Zeng-hong. Determination of pyrethroid multi-residues in vegetables by high-performance liquid chromatography [J]. *Journal of Fuzhou University(Natural Science)*, 2008, 36 (1): 122-125.
- [6] 岳磊, 单国强, 刘雅红, 等. 己烯雌酚特异性抗体的制备[J]. 中国农业科学, 2008, 41(5): 1524-1529.
YUE Lei, SHAN Guo-qiang, LIU Ya-hong, et al. Development of antibodies against diethylstilbestrol[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (5): 1524-1529.
- [7] 曾得意, 王鸣华, 施海燕, 等. 精喹禾灵酶联免疫吸附分析(ELISA)研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 443-449.
ZENG De-yi, WANG Ming-hua, SHI Hai-yan, et al. Study on ELISA for Quizalofop-p-ethyl[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41 (2): 443-449.
- [8] 李波, 施海燕, 王鸣华. 氯氟氰菊酯及其代谢物的人工抗原合成与多克隆抗体的制备[J]. 农药学学报, 2007, 9(4): 415-418.
LI Bo, SHI Hai-yan, WANG Ming-hua. Synthesis of artificial antigen and preparation of polyclonal antibodies against cyhalothrin and its metabolites[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2007, 9 (4): 415-418.
- [9] 刘廷凤, 刘亚子, 孙成. 氯菊酯农药间接酶联免疫吸附测定法的建立[J]. 环境科学, 2006, 27(2): 347-350.
LIU Ting-feng, LIU Ya-zi, SUN Cheng. Indirect ELISA for the pyrethroids-permethrin residue detection[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(2): 347-350.
- [10] 郑伟华, 赵建庄, 马德英, 等. 溴氰菊酯分析法研究进展[J]. 北京农学院学报, 2003, 18(4): 316-320.
ZHENG Wei-hua, ZHAO Jian-zhuang, MA De-ying, et al. Development of determination of deltamethrin[J]. *Beijing Agricultural College*, 2003, 18 (4): 316-320.
- [11] 骆爱芝, 余向阳, 张存政, 等. 拟除虫菊酯类农药残留分析研究进展[J]. 江苏农业学报, 2004, 20(2): 120-125.
LUO Ai-zhi, YU Xiang-yang, ZHANG Cun-zheng, et al. Research progress of residue analysis for pyrethroids[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2004, 20 (2): 120-125.
- [12] 王静, 魏朝俊, 赵建庄, 等. 溴氰菊酯人工抗原的合成及偶联比的测定[J]. 北京农学院学报, 2006, 21(4): 71-74.
WANG Jing, WEI Chao-jun, ZHAO Jian-zhuang, et al. Synthesis of deltamethrin artificial antigen and ultraviolet determination of coupling ratio[J]. *Journal of Beijing Agricultural College*, 2006, 21(4): 71-74.
- [13] 赵建庄, 魏朝俊, 王春娜, 等. 一种溴氰菊酯人工抗原的合成方法及测定方法: 中国, 200610144966.8[P]. 2007, 4, 18.
ZHAO Jian-zhuang, WEI Chao-jun, WANG Chun-na, et al. The synthesis and determination of an artificial antigen for deltamethrin: Chinese, 200610144966.8[P]. 2007, 4, 18.
- [14] Li H J, Shan G M. Enzyme-linked immunosorbent assay for the pyrethroid cypermethrin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 1039-1043.
- [15] Park E K, Kim J H, Gee S J. Determination of pyrethroid residues in agricultural products by an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 5572-5576.
- [16] 朱国念, 毛黎娟, 施海燕, 等. 二氯喹啉酸人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国农业科学, 2005, 38(1): 86-90.
ZHU Guo-nian, MAO Li-juan, SHI Hai-yan, et al. Synthesis and identification of artificial antigen against quinclorac[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38 (1): 86-90.
- [15] 李波, 施海燕, 王鸣华. 联苯菊酯酶联免疫吸附分析方法研究[J]. 分析化学, 2008, 36(1): 34-38.
LI Bo, SHI Hai-yan, WANG Ming-hua. Study on ELISA for bifenthrin[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 36(1): 34-38.
- [16] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 等. 拟除虫菊酯类农药多残留酶免疫分析方法的建立[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 308-312.
LUO Ai-lan, YU Xiang-yang, ZHANG Cun-zheng, et al. Development of enzyme immunoassays for pyrethroids[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38 (2): 308-312.