

三嗪类除草剂免疫分析技术的研究进展

韩正政¹, 刘媛^{1,2,*}, 王健^{1,2,*}, 张俊花¹, 黄伟¹

(1.河北北方学院农林科技学院, 河北张家口 075000;

2.河北北方学院食品安全研究中心, 河北张家口 075000)

摘要:在针对三嗪类除草剂的检测中,免疫分析技术的发展已越来越受到社会的关注,并成为研究的热点。本文主要介绍了免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的几个关键技术环节,即半抗原及人工抗原的设计合成、抗体的制备以及各种免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的应用,并对目前存在的问题和今后的发展方向进行了讨论。

关键词:免疫分析技术,三嗪类,除草剂,农药残留

Research progress of immunoassay on the detection of triazine herbicides

HAN Zheng-zheng¹, LIU Yuan^{1,2,*}, WANG Jian^{1,2,*}, ZHANG Jun-hua¹, HUANG Wei¹

(1.College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2.Food Safety Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: In the detection of triazine herbicides, the development of immunoassay has gotten more and more social attention and it has been the research hotspots. In this study, several key steps of immunoassay on the determination of triazine herbicides were introduced. These steps contained design and synthesis of hapten and artificial antigen, preparation of antibody and the application of many kinds of immunoassay on the detection of triazine herbicides. Besides, the current problems and the prospect of the field were also discussed.

Key words: immunoassay; triazine; herbicides; pesticide residues

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)16-0324-06

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.061

三嗪类除草剂(triazine herbicides)自20世纪50年代问世以来,被广泛用作抑制农田中杂草生长的高效除草剂,其分子结构以六元环为主体由三个C和三个N对称排列,所以也可称作“均三氮苯类除草剂”。常见的三嗪类除草剂品种有阿特拉津(atrazine)、西玛津(simazine)、扑灭津(propazine)等,主要作用原理是通过抑制植物的光合作用来达到除草的目的。但是由于土壤和水中残留的三嗪类除草剂对环境安全和人体健康都有严重的影响^[1],因此早在2007年欧盟就已全部禁用。而此类物质在我国仍然被大量生产和使用,这无疑增大了我国的环境和食品安全风险。

针对三嗪类除草剂,常用检测方法包括:高效液相色谱法、液-质联用法等^[2]。虽然这些方法灵敏、准确,但样品需要繁杂的前处理过程,而且检测时间长,仪器昂贵,技术要求高,不适合大量样品的快速检测,因此迫切需要一种快速、价廉的检测方法作为上述仪器分析方法的补充。免疫分析法(IA)以抗原与抗体的特异性、可逆性结合反应为基础,具有灵敏、简便、分析量大、成本低等优点,非常适宜于复杂

基质中痕量组分的分析以及大批量的检测和筛选实验^[3],已成为分析技术研究的重要领域^[4]。美国化学会(AOAC)甚至将免疫分析技术与液相色谱、气相色谱一同列为农药残留检测的三大支柱技术。

早在1968年,Centeno等人第一次将放射性免疫分析(RIA)应用于马拉硫磷和DDT的检测,自此免疫学检测技术就正式应用到了农药残留检测当中^[5]。到1980年,Hammock和Mumma发表的有关农药半抗原与载体蛋白的连接方法及抗体制备的综述性论文,极大地推动了免疫分析法在农药残留检测中的应用^[6]。1985年又由Huber^[7]建立了阿特拉津酶免疫定性定量分析方法并研制出了阿特拉津酶联免疫试剂盒,从而揭开了免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的应用。国内最早关于农药免疫分析的文献,是黄葵编译的Freia Jung等^[8]关于免疫分析技术在农药分析中应用的综述性文章,系统介绍了农药半抗原的设计合成及与载体蛋白的偶联、抗体的制备、免疫方法的选择、样品制备及结果鉴定等内容。本文将重点介绍针对三嗪类除草剂的半抗原及抗体合成的基本原理及研究动态,各种免疫检测方法的

收稿日期:2017-01-11

作者简介:韩正政(1990-),男,硕士研究生,研究方向:农药残留检测技术,E-mail:498233705@qq.com。

*通讯作者:王健(1980-),男,博士,副教授,研究方向:食品安全检测技术,E-mail:xuanyuanjian0228@126.com。

基金项目:河北省现代农业技术体系蔬菜产业创新团队建设(项目)(HBCT2013050208);国家公益性行为(农业)科研专项(201203094)。

应用进展以及未来的发展方向,以期免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的进一步应用提供理论参考。

1 半抗原与人工抗原的设计及合成

农药通常的相对分子质量都小于 1000,必须与如载体蛋白等这样的大分子物质偶联后才能刺激机体产生抗体,否则不具备针对农药抗原决定簇的特异性,这也是小分子免疫分析的基本模式。免疫分析法建立的关键因素是半抗原的结构是否合理,并能否以此制备稳定且有良好免疫原性的人工抗原。因此,首先需要合成可直接与载体偶联,并最大程度模拟待测分子结构的半抗原。半抗原的典型结构中应具备适当的末端活性基团,诸如-SH、-NH₂、-COOH和-OH等;同时活性基团与载体之间也应具备4~6个碳链长度的间隔臂。然后再将载体蛋白与半抗原结合而制成人工抗原。载体蛋白不是单纯地起运载作用,也不仅是增加半抗原的相对分子质量,而是依靠“免疫原性”这一本身的结构特异性诱导体液抗体的产生进而诱导其对半抗原农药分子的识别,这种现象被称为载体效应^[9]。

常用的载体蛋白有卵清蛋白(OVA)、人血清白蛋白(HAS)、牛血清白蛋白(BSA)及多聚赖氨酸(PLL)等。科研工作者经过大量的研究工作,建立了多种多样的偶联方法,最终解决了如何将半抗原的农药小分子偶联到大分子载体蛋白上的问题。所建立的方法原理一般都是基于利用小分子中的活性部位与蛋白质上的羧基、氨基、巯基、酚基或羟基进行化学反应。常用的偶联反应方法很多,包括重氮化法、混合酸酐法、戊二醛法和碳二亚胺法等,具体选择哪种方法主要考虑农药小分子及其半抗原的分子结构^[10-11]。ELISA包被用的人工抗原与免疫用的人工抗原需采用不同的载体蛋白,以免检测系统因为载体蛋白的干扰而受到影响^[12]。较常采用的免疫载体蛋白为BSA,而OVA常作为包被用载体蛋白。而且最好采用不同的合成路线制备免疫原及包被原。每种农药可利用多种人工合成的半抗原,不同的载体蛋白和偶联剂合成多种人工抗原,再通过免疫反应得出的免疫效果及特异性,筛选出较好的人工抗原。

大多数三嗪类半抗原的制备都是沿用上世纪90年代Goodrow等^[13]的操作步骤。当时,他们利用Schlaeppli等^[14]报道的方法将阿特拉津上的氯原子转变成了羟基,制备出了阿特拉津羟基衍生物,作为半抗原使用。随后,Goodrow的研究团队又对三嗪类除草剂半抗原的设计进行了一系列的优化。他们利用“尺寸排阻”效应设计半抗原,认为半抗原的特征取代基应小于目标分子的取代基,从而产生的多克隆抗体就不会识别大于目标分子的分析物。他们发现在多数检测阿特拉津的ELISA实验中,抗体其实能更好的识别扑灭津。在交叉反应实验中,6位的异丙氨基对扑灭津的识别率是阿特拉津的2.5倍;如果是更小的乙氨基的话,对阿特拉津识别率是100%,西玛津识别率40%,扑灭津识别率降到了72%^[13-15]。

随后,他们用更小的甲基取代基,西玛津和阿特拉津的识别率分别为100%和75%,扑灭津的识别率降低到13%。接下来以硫代替氯作为连接结构,2-巯基丙酸为间隔臂,分别以乙氨基-乙氨基和乙氨基-异丙氨基为取代基的三嗪类除草剂的半抗原就被用来制备多克隆抗体。结果发现前者相比后者极大地提高了对西玛津的识别率(约15倍),对扑灭津识别率降低了一半,相似的结果在Lawruk等的结果中也得到证实。

2 抗体的制备

抗体的发展主要经历了多克隆抗体(Pabs)、单克隆抗体(Mabs)及基因工程抗体3个重要阶段。

Pabs可从免疫原免疫动物血清中直接获得,是应用历史最悠久且获取最容易的抗体制备方法。Mabs来源于免疫小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞融合后筛选出的细胞株,此种细胞株能稳定分泌目标分析物的抗体。在试剂盒研发方面,Mabs比Pabs更具优势,因为前者可以无限量地生产均质抗体。而对于Pabs来说,针对同一只动物的多次采血所获得的抗血清也存在差异。基于以上原因,近年来关于免疫分析检测农药残留的相关文献报道中,Mabs所占比例呈逐年上升趋势。表1中列出了近年来针对三嗪类除草剂的单抗和多抗的使用情况。尽管许多报道都列出了Mabs相对于Pabs的优势,但在多数竞争性免疫检测中使用的还是多克隆抗体。有很多原因可以解释这一现象,一个原因是传统的杂交瘤融合生产抗体的方式既复杂又昂贵,另一个原因就是针对人工抗原的特异性抗体的筛选也是一大难题^[16]。

由于无论是Pabs还是Mabs,其制备方法都耗费高、耗时长且需要动物实验,发展应用受到限制。而基因工程抗体却正以其低免疫原性、高产量等优点,逐渐成为了抗体应用研究的热点。基因工程抗体应用DNA重组技术及基因突变方法改造目标抗体基因的编码序列,来产生自然界中本不存在的蛋白质分子。重组抗体技术,如“噬菌体展示技术”等可通过克隆来生产抗体片段,所产片段能在生长繁殖迅速的大肠杆菌中大量表达,并保持完整的抗体功能,从而极大缩短了特异性抗体的制备时间。ScFv和Fab片段是最常用的抗体片段,比完整的IgG分子具有更高的特异性。重组抗体技术加速了不依赖于动物实验的新抗体技术的发展。近十几年来,基因工程抗体及相关技术在农药残留分析领域研究和应用得到了迅猛发展,有代表性的如1982年Wie^[17]将抗体的Fab片段和ScFv片段应用于莠去津残留的分析上,测定结果的精确性和准确性较为理想。2002年Karl Kramer^[18]建立了针对三嗪类除草剂的类特异性基因抗体库,并采用免疫磁性分离(IMS)方法从21个脾细胞群中筛选针对三嗪类除草剂的特异性抗体基因,大大提高了目的基因在抗体库中的比例。

3 免疫分析方法及在三嗪类除草剂检测中的应用

农药残留的免疫分析方法是在已有免疫学实验的基础上建立起来的,因此它的免疫学反应原理及

表1 单克隆抗体和多克隆抗体在三嗪类除草剂免疫分析中的应用

Table 1 Applications of monoclonal antibodies and polyclonal antibodies in immunoassay of triazine herbicides

作者	抗体类型	三嗪类除草剂种类	最低检出限($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Qie Z et al ^[19]	单克隆抗体	阿特拉津	0.66
Belkhamssa et al ^[20]	单克隆抗体	阿特拉津	0.001
LV Zhi Qiang et al ^[21]	单克隆抗体	阿特拉津	1.97
Won-Bo Shim et al ^[22]	单克隆抗体	阿特拉津、莠去津	3
李伶俐 ^[23]	多克隆抗体	扑草净	0.04 + 0.006
Sonia Herranz et al ^[24]	多克隆抗体	西玛津	0.11 ± 0.02
柳明等 ^[25]	单抗和多抗	阿特拉津	2.34
Leif Bruun ^[26]	7种单克隆抗体	三嗪及其衍生物	0.012~0.108

操作过程都与其他免疫检测方法相类似。按不同的标记物分为:放射性免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)、化学发光免疫分析(CLIA)等。

3.1 放射性免疫分析(RIA)

RIA是以诸如 I^{125} 、 P^{32} 、 H^3 等放射性元素标记抗原或抗体,用液体闪烁计数器等仪器测定 β 射线或 γ 射线的放射性强度,从而测定抗体或抗原量的分析方法。徐德武等^[27]采用 H^3 标记的阿特拉津半抗原建立了快速检测阿特拉津的RIA分析法。研究表明自来水的残留阿特拉津添加回收率为88.5%~107.5%,运河水则为87.4%~110.9%,说明此法对水样中阿特拉津残留分析具有较好的准确性。虽然RIA法特异性强、灵敏度高、技术相对成熟,但它所带来的放射性污染却难以处理,并对人体健康造成潜在危害,因而极大限制了该技术的应用范围。目前该技术已不在三嗪类除草剂快速检测中使用。

3.2 酶免疫分析(ELISA)

ELISA法是目前非放射性免疫快速检测三嗪类除草剂的主流技术。ELISA法的原理是利用酶标记的抗体或抗原进行免疫反应,将免疫反应的高灵敏性和高特异性有机结合在一起,具有简便、灵敏、快速等优点。国外的相关研究起步较早,Huber^[7]于1985年就建立了阿特拉津酶免疫定性定量分析方法,并进行了相关试剂盒研发。随后,Goodrow研究团队^[9-13]一直致力于三嗪类除草剂的半抗原合成及抗体制备的研究,并建立了检测阿特拉津、西玛津和扑灭津等三嗪类除草剂的ELISA检测方法。德国、美国等发达国家已经开发出了应用于食品和环境中的三嗪类除草剂分析的商品试剂盒。Eline P Meulenberg^[28]等人已将三嗪类除草剂的类特异性ELISA试管试剂盒应用于水样的检测,结果显示假阳性率为10%,假阴性率为47%,有可能是操作试管时遇到的实际问题降低了检测的准确性。

近些年来,许多文献相继报道了对于传统ELISA方法的改进。Jasdeep Kaur^[29]等将小分子半抗原直接包被在微量滴定板上检测阿特拉津和2,4-D。他们将聚苯乙烯先后用 HNO_3 和APTES处理,使其表面带有与小分子半抗原连接的氨基,改造后的滴定板表现出了良好的亲和性和稳定性。用该方法检测水样中的阿特拉津, IC_{50} 非常低,可达到 $0.02\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,线性范

围为 $0.01\sim 1000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。Hanna Barchanska^[30]等建立了一种适合于野外大批量样品检测使用的快速试管ELISA,用以检测牛奶中的阿特拉津。经HPLC检测确证可知,ELISA结果灵敏性更高,因为一些样品中的阿特拉津被ELISA检出,而HPLC未检出。Elena V Yazynina^[31]等利用阴阳离子聚电解质之间的静电相互作用,建立了聚电解质ELISA检测阿特拉津,大大缩短了ELISA的检测时间,使原来60 min的抗原抗体结合的孵育时间,缩短为了8 min和5 min的两个步骤。优化后的检测只需40 min,灵敏度为 $0.03\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,在 $0.05\sim 1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内检测变异系数为1.4%~8.0%。

同时,国内也有部分科研团队建立了ELISA快速检测三嗪类除草剂的方法。单国民^[32]以三嗪类除草剂的结构特征为依据,合成得到3种不同半抗原,并制备出3种相应的高效抗体,从而建立了检测阿特拉津、扑灭津和西玛津的ELISA方法,最低检测限分别为1.0、0.5和 $2.0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。邓安平等^[33-34]采用ELISA法分别对水样和土壤中阿特拉津的含量进行了检测,得出水样中阿特拉津测定的线性范围为 $0.05\sim 5.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检出限达 $0.018\sim 0.022\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;随后又对土壤样品中阿特拉津的分离和测定做了研究,发现测定线性范围为 $0.05\sim 5.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检测限在 $0.018\sim 0.024\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内,线性相关系数 $r=0.9922$ 。胡晓航等^[35]采用建立的ELISA方法对土壤中的阿特拉津残留进行定量分析,最低检出限为 $0.04\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,实验证明该方法具有较好的重复性和精确度。

3.3 荧光免疫分析(FIA)

荧光免疫分析是标记免疫技术中最早进行研究的,它集免疫反应的特异性和荧光的敏感性于一身,灵敏度较分光光度法提高约10~100倍。该方法用荧光物质标记抗体或农药半抗原分子,并制备特异性荧光物,两者可发生特异性结合,利用特定荧光分析仪测定荧光物质受激发光照射后发出的荧光强度或偏振幅度等,制得农药浓度—荧光强度曲线,进而实现对农药残留的定性定量分析。近年来,在传统荧光抗体技术的基础上,发展和建立了各种免疫荧光测定法,具体方法有以下几种:时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)、荧光偏振免疫分析(FPIA)、荧光激发共振能量转移免疫分析(FRETIA)和荧光淬灭免疫

分析(FQIA)。

Reimer 等^[36]成功制备了多克隆抗体,并以铕离子(Eu^{3+})作为示踪物,利用 TRFIA 检测水样中的阿特拉津残留,检测限为 $(0.05 \pm 0.03) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $(0.17 \pm 0.08) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,重复实验的相对偏差为 5%。与 ELISA 比较,TRFIA 在准确性、稳定性上均具有优势。Chio 等^[37]建立了一步检测阿特拉津的 FPIA 方法,检出限为 $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,相对标准偏差小于 3%,与草净津和西玛津的交叉反应分别为 1% 和 30%。Schobel^[38]的研究小组成功运用 FRETIA 法对水中西玛津进行检测,以荧光染料 Cy5 和 Cy5.5 分别标记抗体和待测西玛津衍生物半抗原,检测限为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性范围 $0.3 \sim 200.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Matveeva 等^[39]采用反胶束体系免疫荧光淬灭法测定阿特拉津,最低检测限为 $0.15 \sim 0.20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,线性范围 $30 \sim 40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 化学发光免疫分析(CLIA)

CLIA 法是将化学发光或生物发光体系与免疫分析相结合而建立起来的一种新型标记免疫测定技术,具有灵敏度和特异性高等特点。该法是将化学发光物质标记在农药半抗原或抗体上,待免疫反应结束后,加入氧化剂而发光,通过测量化学发光强度来绘制标准曲线从而测定待测农药的浓度。与其他免疫分析法相比,该方法用于三嗪类除草剂的检测还相对较少,有着广阔的发展前景。Samsonova 等^[40]以 5 种抗体的混合物为基础建立了竞争 CLIA 法,并对环境样品中 3 种三嗪类除草剂(阿特拉津、特丁津和莠灭净)进行检测,检出正确率达 70%~100%,该研究为环境监测中多组分分析提供了新的思路。Tudorache 等^[41]建立了一种旨在检测阿特拉津的磁性粒子化学发光酶免疫法,该法将抗体固定于磁性粒子表面,该磁性粒子被磁场作用固定于检测板底部,酶标记阿特拉津和待测物竞争结合抗体,然后加入发光底物液(鲁米诺、过氧化氢、对碘苯酚)进行测定,该方法的检出限为 $3 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$, IC_{50} 为 $37 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$,线性范围为 $10 \sim 1000 \text{ pg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 三嗪类除草剂免疫分析的新进展

4.1 免疫分析技术与其他技术的联用

免疫分析方法和理化分析方法的联合使用,可将免疫分析法的高灵敏性、高特异性和理化分析的高分离能力有机结合起来,是今后检测技术发展的方向之一。Marja E 等^[42]用固相萃取(SPE)的方法对尿液样品进行前处理,排除其中的干扰物,再用 ELISA 法检测其中的阿特拉津代谢物,使检测的灵敏度相比于以往报道提高了 10 倍。此外,将免疫分析法与高效液相色谱法(HPLC)联用,可大大降低分离样品时有机溶剂的用量,使灵敏性大大提高。研究表明免疫分析与气相色谱/质谱(GC/MS)联用可减少农药中结构类似物分析时的交叉反应,从而降低假阳性^[5]。

4.2 多组分分析物免疫分析

多组分分析物免疫分析(MIA)是指在同一样品中,同时测定两种或两种以上的相关分析物的免疫

分析方法。目前,用于农药多残留组分免疫测定的主要有荧光免疫分析法(FIA)、金免疫层析分析法(GICA)、免疫生物传感器(IS)等方法。这些免疫分析方法的核心环节就是制备出能够识别全部一类农药的类特异性抗体。目前用于多残留检测的抗体主要通过以下方法获得,类特异性抗体的制备,“多决定簇”人工抗原制备,双特异性单克隆抗体技术的应用以及重组抗体或单链抗体技术的应用。目前,针对三嗪类除草剂的多残留分析主要是通过设计合成具有三嗪类特征环状结构的半抗原,进而得到类特异性抗体,来实现多种三嗪类除草剂的同时检测。有许多因素能够影响到多残留分析结果的准确性,其中半抗原的设计合成,半抗原与载体的连接方式,抗体的种类和特征以及免疫分析方法的选择等都应该值得特别关注^[43]。

4.3 免疫传感器

生物传感器最可能成为一种快速、灵敏、特异性强、可再生的检测工具。免疫传感器(IS)是生物传感器的一种,是基于固相免疫分析的生物传感器。它是一种便携微型化的检测装置,能够通过抗体特异性识别目标物,并产生与浓度值相对应的可转换信号。IS 包括以下三部分:①生物部分—抗体。抗体使得传感器具有特异性和敏感性特征。②转换器。转换器可将抗体与目标物特异性结合后产生的光、热等物理化学信号转换成电信号。③电部分。扩大化和数字化转换器所产生的电信号,便于实验结果的统计和保存。在农药残留检测中,与免疫化学技术相结合的转换器主要有电化学转换器、光学转换器及压力转换器等。自 20 世纪 90 年代后期,免疫传感器技术在三嗪类除草剂检测中得到了迅猛发展^[44-46],从而使免疫检测手段朝着自动化、简便化、快速化的方向发展。目前主要困扰免疫传感器发展的问题是合适的抗原或抗体的制备、传感器的使用寿命以及信号的稳定性等方面有待进一步完善^[47]。

4.4 流动注射免疫分析技术

流动注射免疫分析(FIIA)是由流动注射分析(FIA)与竞争酶免疫技术结合而成,是现代免疫检测技术的主要发展方向之一。FIIA 的灵敏度可以通过标记物的选取、多重标记、检测手段灵敏度的提高来实现。FIIA 分析所需时间可由 ELISA 的 1.5 h 缩短至 6.5 min。Milan Fránek 等^[48]用 FIIA 方法分析阿特拉津、西玛津和 2,4-D 的含量,并对混合抗体的反应器的制备进行了尝试。该方法的不足之处是稳定性较差,抗体和酶标半抗原的使用量较大,一次只能检测一个样品,以上方面有待进一步改进。

5 结论与展望

在针对三嗪类除草剂的检测中,研究者们日益注重免疫分析技术的开发和应用,使该领域成为研究热点。免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的几个关键技术环节,即半抗原及人工抗原的设计合成、抗体的制备以及各种免疫分析技术在三嗪类除草剂检测中的应用均得到了不断开发和充实。免疫分析技术将会在三嗪类除草剂残留快速检测中发挥越来越

越重要的作用。目前,市场上已有商业化生产的三嗪类除草剂残留免疫检测试剂盒问世。但是该技术的研究和开发应用仍存在很多尚待解决的问题。例如针对一类或一种三嗪类除草剂分子的特异性半抗原的设计合成,高效的标准化抗体的生产技术以及多残留检测技术的研发等都有待进一步完善,以上问题的深入研究必将成为免疫技术在三嗪类除草剂检测中未来的发展方向。

参考文献

- [1] Baranowska I, Barchanska H, Pacak E. Procedures of trophic Chain samples preparation for determination of triazines by HPLC and metals by ICP-AES methods [J]. Environ Pollut, 2006, 143 (2): 206-211.
- [2] 王晓春, 王广, 焦杏春. 三嗪类除草剂分析方法研究进展 [J]. 农药, 2011, 50(5): 320-324.
- [3] 黎其万, 潘灿平. 农药残留免疫分析方法及其应用研究进展 [J]. 西南农业学报, 2004, 1(2): 248-252.
- [4] 杨依军, 王勇, 杨秀荣, 等. 免疫分析法在农药残留分析中的应用 [J]. 华北农学报, 2001, 16(4): 119-124.
- [5] 郑晓冬, 何丹. 食品中农药残留免疫检测技术的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2004, 4(2): 88-94.
- [6] Hammock B D, Mumma R O. Recent advances in pesticide analytical methodology [J]. Journal of the American Chemical Society, 1980, 321-352.
- [7] Huber S. Improved solid-phase enzyme immunoassay systems in the ppt range for atrazine in fresh water [J]. Chemosphere, 1985, 14(11-12): 1795-1803.
- [8] Jung F, 黄葵. 免疫分析技术在农药分析中的应用 [J]. 国外农业环境保护, 1991(4): 17-19.
- [9] 汪尔康. 21 世纪的分析化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 269-284.
- [10] Sun P, Kobayashi N, Goto J. Design and synthesis of 6 α -Corticosterone haptens and their bovine serum albumin (BSA) conjugates [J]. Chinese Chemical Letters, 2003, 14(3): 259-2621.
- [11] Brum E M, Garcés - García M, Puchades R, et al. Highly sensitive enzyme - linked immunosorbent assay for chlorpyrifos application to olive oil analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(24): 9352-9360.
- [12] 范作舟, 徐加发, 等. 酶联免疫分析技术研究进展 [J]. 分析科学学报, 2011, 27(1): 113-118.
- [13] M H Goodrow, R O Harrison, B D Hammock. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s - triazine herbicides [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(4): 990-996.
- [14] J Schlaeppli, W Föry, K Ramsteiner. Hydroxyatrazine and atrazine determination in soil and water by enzyme - linked immunosorbent assay using specific monoclonal antibodies [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989, 37(6): 1532-1538.
- [15] R O Harrison, M H Goodrow, B D Hammock. Competitive inhibition ELISA for the s - triazine herbicides: assay optimization and antibody characterization [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(1): 122-128.
- [16] K Charlton, W J Harris, A J Porter. The isolation of super-sensitive anti - hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2001, 16(9-12): 639-646.
- [17] Wie S I, Hammock B D. Development of enzyme - linked immunosorbent assays for residue analysis of diflufenuron and BAY SIR 8514 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1982, 3(5): 949-957.
- [18] Karl Kramer. Synthesis of a group-selective antibody library against haptens [J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 266 (1-2): 209-220.
- [19] Qie Z, Bai J, Xie B, et al. Sensitive detection of atrazine in tap water using TELISA [J]. Analyst, 2015, 140(15): 5220-5226.
- [20] Belkhamssa N, Justino CI, Santos PS, et al. Label - free disposable immunosensor for detection of atrazine [J]. Talanta, 2015, 146(1): 430-434.
- [21] LV Zhi Qiang, WANG Cai Hong, WANG Ting Ting, et al. Detection of Atrazine Residue in Food Samples by a Monoclonal Antibody - based Enzyme - linked Immunosorbent Assay [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2013, 26(5): 389-402.
- [22] Won - Bo Shim, Zheng - You Yang, Ji - Young Kim, et al. Immunochromatography Using Colloidal Gold - Antibody Probe for the Detection of Atrazine in Water Samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(26): 9728-9734.
- [23] 李伶俐. 三嗪类除草剂扑草净快速免疫检测方法的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
- [24] Sonia Herranz, Javier Ramón - Azcón, Elena Benito - Peña, et al. Preparation of antibodies and development of a sensitive immunoassay with fluorescence detection for triazine herbicides [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391(5): 1801-1812.
- [25] 柳明, 祁军, 刘磊, 等. SPR 免疫传感技术检测水中阿特拉津除草剂 [J]. 解放军预防医学杂志, 2013, 31(4): 299-301.
- [26] Leif Bruun, Claus Koch, Mogens Havsteen Jakobsen, et al. Characterization of monoclonal antibodies raised against different structures belonging to the s - triazine group of herbicides [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 436(1): 87-101.
- [27] 徐德武, 朱永清. 用放射免疫测定法分析水中莠去津残留量的研究 [J]. 莱阳农学院学报, 2000, 17(3): 225-228.
- [28] Eline P Meulenberg, L G de Vree, J Dogterom. Investigation of indicative methods in the Netherlands: validation of several commercial ELISAs for pesticides [J]. Analytica Chimica Acta, 1999, 399(1-2): 143-149.
- [29] Jasdeep Kaur, Robin C Boro, Nishima Wangoo, et al. Direct hapten coated immunoassay format for the detection of atrazine and 2, 4 - dichlorophenoxyacetic acid herbicides [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 607(1): 92-99.
- [30] Hanna Barchanska, Elzbieta Jodo, Robert Graham Price, et al. Monitoring of atrazine in milk using a rapid tube-based ELISA and validation with HPLC [J]. Chemosphere, 2012, 87(11): 1532-1538.

1330-1334.

[31] Elena V Yazynina, Anatoliy V Zherdev, Boris B Dzantiev, et al. Microplate immunoassay technique using polyelectrolyte carriers: kinetic studies and application to detection of the herbicide atrazine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 399(1-2): 151-160.

[32] 单国民, 钱传范, 过琴媛, 等. 三氮苯类除草剂的酶联免疫吸附测定[J]. *中国农业大学学报*, 1996, 1(3): 52-58.

[33] 邓安平, Milan F. 酶联免疫吸附分析法测定水样中的阿特拉津[J]. *分析化学*, 1998, 26(1): 29-33.

[34] 邓安平, 杨红, Milan F. 酶联免疫吸附分析法测定土壤试样中的阿特拉津[J]. *分析化学*, 1999, 27(6): 657-660.

[35] 胡晓航, 王哲玮, 吴玉梅, 等. 酶联免疫法测定土壤中莠去津[J]. *中国糖料*, 2011(1): 28-30.

[36] Reimer G J, Gee S J, Hammock B D. Comparison of a time-resolved fluorescence immunoassay and an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of atrazine in water[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(8): 3353-3358.

[37] Choi M J, Lee J R, Eremin S A. Development of single reagent for fluorescence polarization immunoassay of atrazine[J]. *Food and Agricultural immunology*, 2002, 14(2): 107-120.

[38] Schobel U, Egelhaaf H J, Brecht A, et al. New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10(6): 1107-1114.

[39] Matveeva E G, Melik-Nubarov N S, Miethe P, et al. Antigen-antibody interactions in the reverse micellar system: quenching of the fluorescence of fluorescein-labeled atrazine by antibodies against atrazine[J]. *Analytical Biochemistry*, 1996, 234(1): 13-18.

[40] Jeanne V Samsonova, Maya Yu Rubtsova, Anna V Kiseleva, et al. Chemiluminescent multiassay of pesticides with horseradish

peroxidase as a label[J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, 14(3): 273-281.

[41] Tudorache M, Tencaliec A, Bala C. Magnetic bead-based immunoassay as a sensitive alternative for atrazine analysis[J]. *Talanta*, 2008, 77(2): 839-8431.

[42] Koivunen M E, Dettmer K, Vermeulen R, et al. Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis—Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE)[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 572(2): 180-189.

[43] Hongyan Zhang, Shuo Wang, Guozhen Fang. Applications and recent developments of multi-analyte simultaneous analysis by enzyme-linked immunosorbent assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2011, 368(1-2): 1-23.

[44] L Campanella, S Eremin, D Lelo, et al. Reliable new immunosensor for atrazine pesticide analysis[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 156(1): 50-62.

[45] S Hleli, C Martelet, A Abdelghani, et al. Atrazine analysis using an impedimetric immunosensor based on mixed biotinylated self-assembled monolayer[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 113(2): 711-717.

[46] Ramón-Azcón J, Kunikata R, Sanchez F J, et al. Detection of pesticide residues using an immunodevice based on negative dielectrophoresis[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(6): 1592-1597.

[47] 严智燕, 周立群. 生物传感器在农药残留检测中的应用[J]. *农药研究与应用*, 2010, 14(3): 6-10.

[48] Milan Frúnek, Anping Deng, Vladimír Kolář. Performance characteristics for flow injection immunoassay using monoclonal antibodies against s-triazine and 2,4-D herbicides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 412(1-2): 19-27.

(上接第323页)

[64] Villalobos M D C, Serradilla M J, Martín A, et al. Use of equilibrium modified atmosphere packaging for preservation of 'San Antonio' and 'Banane' breba crops (*Ficus carica* L.)[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2014, 98: 14-22.

[65] Jeong M, An D S, Ahn G, et al. Master packaging system for sweet persimmon applicable to produce supply chains[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 86: 141-146.

[66] Ahn G H, Jeong M, An D S, et al. Quality preservation of sweet persimmon by using master packaging system[J]. *Italian Journal of Food Science*, 2012, 24(4): 67-71.

[67] Jeong M, An D S, Lee S J, et al. Note the quality of king oyster mushrooms stored with a master packaging system consisting of inner individual packs and an outer liner bag to be dismantled at a retail display[J]. *Food Science and Technology Research*, 2012, 18(4): 535-541.

[68] Kim H K, An D S, Lee S J, et al. Dependence of individual primary package atmosphere on retail display temperature and micro-perforations in a master packaging system for chestnuts[J]. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2012, 10(3&4): 168-172.