DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.01550

二甲氧基硫代磷酸酯类农药多残留免疫分析方法研究

李永祥[1]　徐振林[1]　王 弘[1]　雷红涛[1]　孙远明[1]
沈 丹[2]　杨金易[1]　沈玉栋*[1]
[1](华南农业大学食品学院，广东省食品质量安全重点实验室，广州 510642)
[2](广州市动物卫生监督所，广州 510440)

摘　要　以二甲氧基硫代磷酸酯类农药为目标，设计合成了系列半抗原及抗原，制备了 4 种宽谱特异性抗体。研究结果表明，含不饱和烷烃手臂的半抗原所制备的抗体宽谱特异性优于含酰胺键手臂的半抗原所制备的抗体。采用目标待测物的特征“次级结构”作为包被半抗原可显著提高 ELISA 检测灵敏度。经条件优化建立的最佳间接竞争 ELISA 多残留检测方法可同时检测 8 种常用高毒农药，其检出限(LOD)在 2.6 ~ 104 μg/kg 之间，符合相关限量标准要求。生菜样品药物添加平均回收率为 73.9% ~121.4%；平均相对标准偏差为 10.6% ~ 18.4%。菜心样品药物添加平均回收率为 80.4% ~ 121.2%；平均相对标准偏差为 13.5% ~24.4%。方法精密度均达到气相色谱法的检测水平。

关键词　有机磷农药；多残留检测；异源包被；酶联免疫吸附分析

1　引　言

有机磷农药在农业生产中被广泛使用，促进了粮食生产[1]，但也造成了食物和环境中普遍存在有机磷农药残留问题[2]。我国在 2002 年已经明令禁止或限制 17 种有机磷农药的使用，但有机磷农药引起的中毒事件仍时有发生，需要加强对其监测。免疫分析方法被认为是一种灵敏、高效、低成本的农药残留检测手段[3]。已有许多关于农药单残留免疫分析方法的报道[4~6]，但有机磷农药种类多样且复配使用现象严重，食品及环境样品常残留多种有机磷农药，建立农药多残留免疫分析筛检方法更具应用价值。

目前，针对二甲氧基硫代磷酸酯类农药进行宽谱特异性抗体制备已有报道，主要是以膦酸基或二甲氧基硫代磷酸酯为半抗原基本结构制备直链型半抗原来制备宽谱特异性抗体[7,8]，但灵敏度普遍偏低。Liu 等[9]制备了同时含二甲氧基硫代磷酸酯和苯环的通用半抗原，获得的抗体灵敏度有所提高，但其宽谱特异性仍有待提高。本研究在探讨半抗原与抗体及酶联免疫吸附分析(ELISA)方法灵敏度的构效关系基础上，采用特征“次级结构”异源包被策略，建立了灵敏度高，特异性识别谱宽，精密度达到气相色谱检测水平的农药多残留 ELISA 检测方法，为进一步开发试剂盒奠定了基础。

2　实验部分

2.1　仪器与试剂

HP1100 液质联用仪(美国 Agilent 公司)；DRX-400/600 核磁共振仪(德国 Burker 公司)；UV-160A 紫外-可见扫描仪(日本 Kyoto 公司)；MK3 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)；6K-15 高速冷冻离心机(德国 Sartorius 公司)；MODEL 1575 洗板机(Bio-Rad 公司)。

农药标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)；牛血清蛋白(Bovine serum albumin，BSA，M_W 67000)、卵清蛋白(Ovalbumin，OVA，M_W 42700)、二环已基碳二亚胺(DCC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏佐剂(美国 Sigma 公司)；*N*,*N*-二甲基甲酰胺(DMF，天津大茂化学试剂厂)；辣根过氧化物酶标记羊抗兔(IgG，武汉博士德生物工程有限公司)；其余化学试剂均为国产分析纯；叶菜类蔬菜为市售。

2010-04-01 收稿；2010-06-18 接受
本文系国家自然科学基金(No. 30901005)、国家 863 计划(No. 2007AA10Z437)、广东省科技计划项目(Nos. 2009A020101004，2009B011300005)和华南农业大学新学科扶持基金(No. 5100-K08198)资助项目
* E-mail: shenyudong@scau.edu.cn

2.2　实验方法

2.2.1　半抗原设计与合成　根据二甲氧基硫代磷酸酯类农药的结构特征,设计了系列含不同手臂及取代位置的半抗原。其合成路线与结构如图 1 所示。其中 H1′~H4′按照本研究前期研究报道[10]方法合成,H5′和 R′-NH_2为商品化试剂,半抗原 H1~H7 参照文献[11]方法合成。

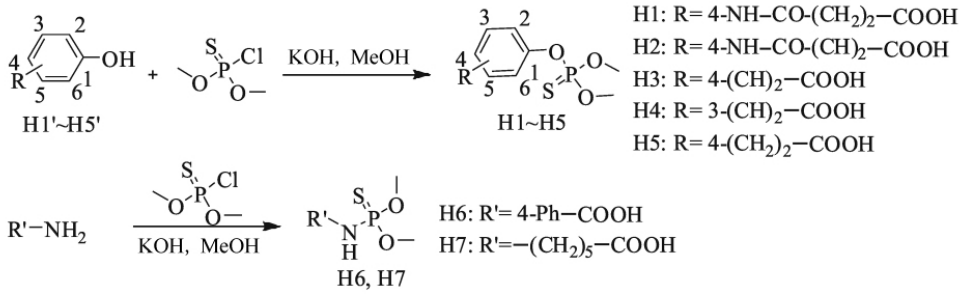

图 1　半抗原 H1~H7 的合成路线

Fig. 1　Synthesis routes of haptens H1 - H7

2.2.2　抗原制备与鉴定　人工抗原制备及鉴定采用文献[12,13]方法。

2.2.3　多克隆抗体制备　参考文献[14]的免疫方案,免疫 5 次,最后一次免疫 10 d 后采血。用辛酸-硫酸铵法纯化抗血清[15],得到 4 种多克隆抗体(PAb)。

2.2.4　ELISA 方法建立　用间接竞争 ELISA 方法[16]分别测定甲基对硫磷在不同反应条件下对 3 种抗体(PAb-H1~PAb-H3)的半抑制浓度(IC_{50})。

用方阵滴定优化各包被原浓度和抗体稀释倍数,建立每个抗体对 12 种有机磷农药的同源 ELSIA 检测方法,选择宽谱特异性最好的抗体建立异源包被间接竞争 ELISA 方法,测定 12 种二甲氧基硫代磷酸酯农药的 IC_{50}和检出限(LOD),IC_{50}和 LOD 值分别为竞争抑制 50% 和 10% 时的药物浓度。

3　结果与讨论

3.1　抗原设计合成与鉴定

通常设计半抗原时保留大多数目标分析物质共有特征结构有利于制备宽谱特异性的抗体[14]。二甲氧基硫代磷酸酯类农药绝大部分含有二甲氧基硫代磷酸酯和芳香环两大特征结构,而半抗原手臂为 3~6 个长度的烷烃最有利于动物产生免疫应答[17]。因此,本研究以苯环和二甲氧基硫代磷酸酯为骨架,设计合成了手臂为 3~4 个碳原子长度的半抗原 H1~H5。另外,异源包被通常可显著提高药物 ELISA 检测灵敏度[9,10,18],因而还设计合成了 H6、H7 用于制备包被原。半抗原 H1-H7 的波谱鉴定数据如下:

H1: APCI-MS m/z 334.3 $[M+H]^+$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 2.62~2.72(m, 4H), 3.83(d, J=13.74 Hz, 6H), 7.08 (d, J=7.86 Hz, 2H), 7.45(d, J=8.29 Hz, 2H), 8.10 (s, 1H)。

H2: APCI-MS m/z 332.1 $[M+H]^+$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 3.87(d, J=13.80 Hz, 6H); 6.45(d, J=12.82 Hz, 1H); 6.62(d, J=12.86 Hz, 1H); 7.21(d, J=8.91 Hz, 2H); 7.66(d, J=8.94 Hz, 2H); 9.30(s, 1H)。

H3: APCI-MS m/z 287.1 $[M-H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 3.87(d, J=13.84 Hz, 6H); 6.39(d, J=15.96Hz, 1H); 7.22(d, J=7.90Hz, 2H); 7.55(d, J=8.51Hz, 1H); 7.75(d, J=15.96Hz, 2H)。

H4: APCI-MS m/z 287.1 $[M-H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 3.88(d, J=13.83Hz, 6H); 6.45(d, J=15.96Hz, 1H); 7.224~7.246(m, 1H); 7.36(s, 1H); 7.39(d, J=4.86 Hz, 2H), 7.76(d, J=15.92Hz, 1H)。

H5: APCI-MS m/z 289.2 $[M-H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 2.67(dd, J=7.40 Hz, J=8.10Hz, 2H); 2.94(dd, J=3.90Hz, J=11.36Hz, 2H); 3.85(d, J=13.72 Hz, 6H); 7.10 (dd,

$J=1.40$ Hz, $J=8.35$ Hz, 2H); 7.18(d, $J=7.64$ Hz, 2H)。

H6: APCI-MS m/z 260.1 $[M-H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 3.78(d, $J=14.17$ Hz, 6H); 5.71(d, $J=14.85$Hz, 1H); 7.04(d, $J=8.81$Hz, 2H); 8.02(d, $J=8.65$Hz, 2H)。

H7: APCI-MS m/z 254.2 $[M-H]^-$, ^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$, TMS): δ 1.38(tt, $J=6.25$ Hz, $J=10.43$ Hz, 2H), 1.51(td, $J=7.47$ Hz, $J=19.43$Hz, 2H), 1.65(td, $J=7.44$ Hz, $J=15.14$ Hz, 2H), 2.37(t, $J=7.39$ Hz, 2H), 2.94(d, $J=7.99$ Hz, 2H), 3.01(s, 1H), 3.69(d, $J=13.66$ Hz, 6H)。

H1~H3 和 H5 与 BSA 偶联获得 4 个免疫原; H1~H7 与 OVA 偶联获得 7 个包被原。人工抗原的紫外扫描结果显示: 与相应半抗原和载体蛋白比较,偶联产物的最大紫外吸收峰在波长 215~225 nm 或 270~280 nm 范围发生了明显变化,证明人工抗原合成成功。

3.2 ELISA 条件优化

由图 2 可知,甲醇浓度(图 2a)与抗体反应时间(图 2b)对 ELISA 方法的检测灵敏度影响较大,而二抗反应时间(图 2c)封闭液种类(表 1)对方法灵敏度的影响不显著。综合考虑多种药物间的溶解度差异及所需检测时间,确定最佳的间接竞争 ELISA 条件为 15% 甲醇、5% 脱脂奶粉作封闭液、抗体及羊抗兔 IgG 反应时间为 30 min。

表 1 使用不同封闭液时抗体对甲基对硫磷的 IC_{50} 值(mg/kg)

Table 1 IC_{50}(mg/kg) of parathion-methyl in indirect competitive ELISA with different blocking agent

封闭液 Blocking agent	PAb-H1	PAb-H2	PAb-H3
1% OVA	0.95	0.19	1.98
3% 甘氨酸 Glycine	2.56	0.20	1.69
5% 脱脂奶粉 Skinning milk	0.70	0.24	1.62

PAb: Polycolonal antibody; OVA: Ovalbumin.

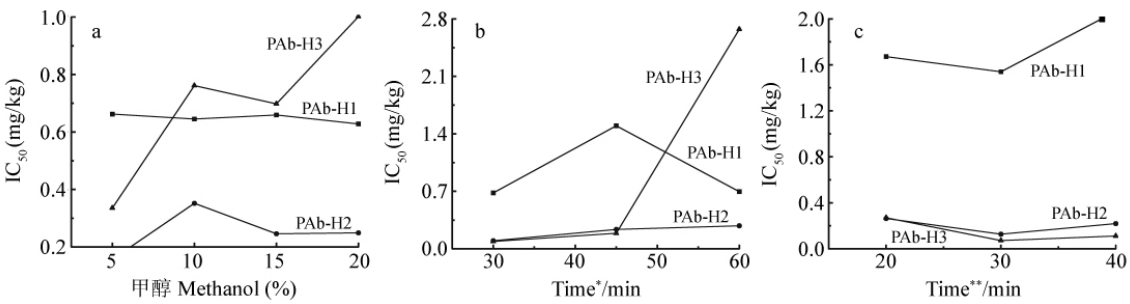

图 2 ELISA 反应条件优化(以甲基对硫磷为例)

Fig. 2 Optimization of ELISA condition (using parathion-methyl as analyte)

*. 多克隆抗体的反应时间(Reaction time of polycolonal antibody(PAb)); **. 羊抗兔 IgG 的反应时间(Reaction time of goat anti-rabbit IgG)。

3.3 免疫半抗原结构对抗体特异性的影响

结果表明,在最佳 ELISA 条件下,4 种抗体对 12 种药物的宽谱特异性存在显著差异。由表 2 中的 IC_{50}值和交叉反应率(CR)可知,4 个抗体的宽谱特异性从优至劣的顺序为 PAb-H3 > PAb-H5 > PAb-H1 > PAb-H2,说明半抗原结构对抗体宽谱特异性有显著影响。半抗原 H1 和 H2 为含酰胺键手臂,其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; 与 H5 相比,H3 手臂上的不饱和键使其具有一定的刚性结构,偶联蛋白后可以使特征基团更多地暴露[19],利于增强动物免疫应答,因此免疫所得到的抗体广谱特异性和亲和力最好。

3.4 包被半抗原结构对 ELISA 方法灵敏度的影响

选取抗体 PAb-H3 建立了 3 种异源包被 ELISA 检测方法。从表 3 可见,包被原的异源程度越大,检测灵敏度越高,此结果与文献[18]报道的一致。同源包被时,PAb-H3 只能较好识别 9 种药物,而用含间位手臂的 H4-OVA 作包被原则能够识别出全部 12 种药物; 以改变磷酸酯基团原子组成的 H6-OVA 包被,可检出 11 种药物(0.38~16.57 mg/kg),且灵敏度相对 H4-OVA 包被(0.88~23.27 mg/kg)有很大提高。使用与免疫半抗原 H3 异源程度最大的特征"次级结构"包被原 H7-OVA 包被时 ELISA 灵敏度最

高(0.10 ~8.95 mg/kg),对 8 种农药的检出限(LOD)分别在 2.6 ~104 μg/kg 之间,达到相关限量标准要求。因此,采用目标待测物共有的二甲氧基硫代磷酸酯特征"次级结构"作为包被半抗原,可显著提高农药多残留 ELISA 检测灵敏度。

表 2　同源包被下不同抗体对 12 种有机磷农药的 IC_{50} 值(mg/kg)及交叉反应率(%)

Table 2　IC_{50} (mg/kg) and Cross-reactivity (%) of 12 organophosphorus pesticides in indirect competitive ELISA with homologous coating

化合物 Compound	PAb-H1		PAb-H2		PAb-H3		PAb-H4	
	IC_{50}	CR[a]	IC_{50}	CR[a]	IC_{50}	CR[a]	IC_{50}	CR[a]
半抗原 Hapten[b]	0.51	100.0	0.03	100.0	4.13	100.0	1.11	100.0
异氯磷 Dicapthon	8.83	5.7	2.23	1.1	1.08	383.7	2.42	45.7
杀螟腈 Cyanophos	1.31	38.9	1.76	1.4	0.58	710.6	5.87	18.8
甲基对硫磷 Parathion-methyl	2.02	25.1	1.04	2.4	1.77	233.0	6.33	17.5
杀螟硫磷 Fenitrothion	2.00	25.4	0.87	2.9	4.92	83.9	34.65	3.2
倍硫磷 Fenthion	9.35	5.4	0.99	2.5	20.49	20.2	2.83	39.1
皮蝇磷 Fenchlorphos	>100	<0.5	>100	<0.03	2.31	179.0	18.17	6.1
甲基毒死蜱 Chlorpyrifos-methyl	>100	<0.5	>100	<0.03	3.69	111.8	35.99	3.1
溴硫磷 Bromophos	>100	<0.5	>100	<0.03	7.51	55.0	>100	<1.1
碘硫磷 Iodofenphos	>100	<0.5	>100	<0.03	>100	<4.1	>100	<1.1
伐灭磷 Famphur	14.79	3.4	>100	<0.03	8.85	46.6	5.34	20.7
稻丰散 Phenthoate	>100	<0.5	>100	<0.03	>100	<4.1	>100	<1.1
虫螨畏 Methacrifos	>100	<0.5	>100	<0.03	>100	<4.1	24.55	4.5

a. 交叉反应率为药物的 IC_{50} 值与半抗原的 IC_{50} 值的百分比 (Cross-reactivity(CR) is the percentage of pesticide IC_{50} to hapten IC_{50});
b. 相应多克隆抗体的免疫半抗原(Immunizing haptens of corresponding PAb)。

表 3　异源包被对 PAb-H3 建立的 ELISA 灵敏度(IC_{50} 值,mg/kg)的影响

Table 3　IC_{50} values (mg/kg) of 12 organophosphorus pesticides in indirect competitive ELISA with PAb-H3

药物 Pesticide	H3-OVA	H4-OVA	H6-OVA	H7-OVA
异氯磷 Dicapthon	1.08	0.95	0.38	0.38
杀螟腈 Cyanophos	0.58	0.88	0.72	0.10
甲基对硫磷 Parathion-methyl	1.77	1.63	1.07	0.28
杀螟硫磷 Fenitrothion	4.92	2.22	1.14	0.41
倍硫磷 Fenthion	20.49	7.82	3.22	0.13
皮蝇磷 Fenchlorphos	2.31	7.15	3.44	3.93
甲基毒死蜱 Chlorpyrifos-methyl	3.69	7.82	6.27	2.65
溴硫磷 Bromophos	7.51	9.63	6.42	2.80
碘硫磷 Iodofenphos	>100	19.73	8.37	2.07
伐灭磷 Famphur	8.85	19.69	8.43	1.14
稻丰散 Phenthoate	>100	6.77	16.57	8.95
虫螨畏 Methacrifos	>100	23.27	>100	4.34

3.5　ELISA 标准曲线的建立

以最优组合 PAb-H3/H7-OVA,在优化的 ELISA 条件下建立了 8 种二甲氧基硫代磷酸酯类农药的标准工作曲线(图 3)。

3.6　添加回收实验

将两种叶菜类蔬菜(生菜、菜心)打浆,分别添加 3 个浓度的单一农药标准液,通过工作曲线测定样品农药含量,每个水平做 4 次平行实验。

实际样品药物添加回收实验表明(表 4),生菜样品平均回收率为 73.9% ~121.4%,平均相对标准偏差为 10.6% ~18.4%;菜心样品平均回收率为 80.4% ~121.2%,平均相对标准偏差为 13.5% ~24.4%,均达到气相色谱法检测水平,可满足实际样品中二甲氧基硫代磷酸酯类农药残留检测需要。

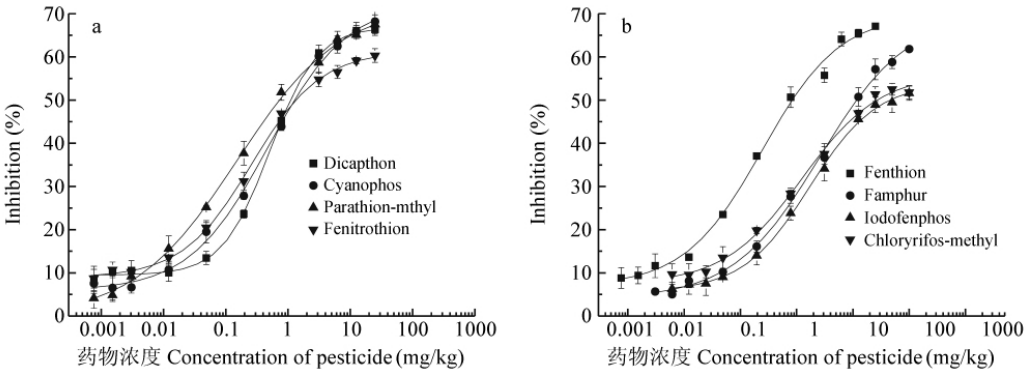

图3 8种有机磷农药的标准工作曲线

Fig. 3 Standard working curves of 8 organophosphorus pesticides

表4 2种蔬菜的添加回收实验

Table 4 Recovery test of two kinds of vegetables ($n=4$)

药物 Pesticide	添加量 Added (mg/kg)	生菜样品 Lettuce sample			菜心样品 Pakchoi sample		
		测定值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=4$)	测定值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=4$)
杀螟腈 Cyanophos	1.04	0.97 ± 0.07	84.3	10.5	0.87 ± 0.12	106.9	14.5
	0.21	0.16 ± 0.02			0.25 ± 0.03		
	0.04	0.03 ± 0.01			0.05 ± 0.01		
倍硫磷 Fenthion	1.27	1.51 ± 0.10	84.1	16.8	1.08 ± 0.28	99.0	18.7
	0.25	0.18 ± 0.04			0.31 ± 0.07		
	0.05	0.03 ± 0.01			0.05 ± 0.01		
甲基对硫磷 Parathion-methyl	2.78	2.32 ± 0.67	89.9	18.4	2.33 ± 0.62	80.4	16.8
	0.56	0.52 ± 0.07			0.40 ± 0.03		
	0.11	0.10 ± 0.01			0.09 ± 0.02		
异氯磷 Dicapthon	3.82	3.16 ± 0.40	85.2	10.6	3.10 ± 0.62	96.8	18.6
	0.76	0.54 ± 0.05			0.70 ± 0.11		
	0.15	0.16 ± 0.02			0.18 ± 0.04		
杀螟硫磷 Fenitrothion	4.07	4.17 ± 1.19	109.2	17.8	3.46 ± 0.92	100.7	24.4
	0.81	0.97 ± 0.12			0.82 ± 0.16		
	0.16	0.17 ± 0.02			0.19 ± 0.05		
伐灭磷 Famphur	5.71	6.78 ± 1.32	102.5	17.7	5.76 ± 1.1	101.1	15.5
	1.14	1.28 ± 0.24			1.33 ± 0.21		
	0.23	0.17 ± 0.03			0.18 ± 0.02		
碘硫磷 Iodofenphos	10.35	12.44 ± 3.20	121.4	17.2	13.34 ± 2.02	121.2	17.0
	2.07	2.49 ± 0.24			2.37 ± 0.34		
	0.41	0.51 ± 0.08			0.50 ± 0.11		
甲基毒死蜱 Chlorpyrifos-methyl	13.23	9.62 ± 2.57	73.9	18.3	15.96 ± 2.20	114.9	13.5
	2.65	1.89 ± 0.38			2.96 ± 0.42		
	0.53	0.41 ± 0.03			0.60 ± 0.08		

References

1 Sultatos L G. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **1994**, 43(3): 271 ~ 289

2 Hallberg G R. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **1989**, 26(3-4): 299 ~ 367

3 Farre M, Kantiani L, Barcelo D. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 26(11): 1100 ~ 1112

4 WANG Huang(王 华), XIONG Han-Guo(熊汉国), ZHANG Ding-Lian(张丁联), PAN Jia-Rong(潘家荣). *Food Research And Development*(食品研究与开发), **2007**, 28(3): 122 ~ 126

5 WANG Jun-Dong(王俊东), SHI Hai-Yan(施海燕), YE Yong-Hao(叶永浩), WANG Ming-Hua(王鸣华). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2009**, 37(1): 82 ~ 86

6 Li Z K, Zhu Y Y, Yin X G, Peng C F, Chen W, Liu L Q, Yin L M, Xu C L. *Immunological Investigations*, **2009**, 38(6): 510 ~ 525
7 Johnson J C, Van Emon J M, Pullman D R, Keeper K R. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46(8): 3116 ~ 3123
8 LIU Xian-Jin(刘贤进), YAN Chun-Rong(颜春荣), LIU Yuan(刘 媛), YU Xiang-Yang(余向阳), ZHANG Cun-Zheng(张存政). *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), **2008**, 41(3): 727 ~ 733
9 Liu Y, Lou Y, Xu D, Qian G L, Zhang Q, Wu R R, Hu B S, Liu F Q. *Microchemical Journal*, **2009**, 93(1): 36 ~ 42
10 XIE Gui-Mian(谢桂勉), SUN Yuan-Ming(孙远明), XU Zhen-Lin(徐振林), LI Yong-Xiang(李永祥), LEI Hong-Tao(雷红涛), WANG Hong(王 弘), SHEN Yu-Dong(沈玉栋). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2009**, 30(11): 2193 ~ 2198
11 Jang M S, Lee S J, Xue X P, Kwon H M, Ra C S, Lee, Y T, Chung T. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **2002**, 23(8): 1116 ~ 1120
12 Cho Y A, Seok J, Lee H, Kim Y J, Park Y C, Lee Y T. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 522(2): 215 ~ 222
13 Singh K V, Kaur J, Varshney G C, Raje M, Suri C R. *Bioconjugate Chemistry*, **2004**, 15(1): 168 ~ 173
14 Spinks C A. *Trends in Food Science & Technology*, **2000**, 11(6): 210 ~ 217
15 Wengatz I, Stoutamire D W, Gee S J, Hammock B D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**, 46(6): 2211 ~ 2221
16 Crowther J R. *The ELISA Guidebook*. Totowa: Humana Press, **2000**: 149 ~ 152
17 Newman D J, Price C P. *Therapeutic Drug Monitoring*, **1996**, 18(4): 493 ~ 497
18 Xu Z L, Xie G M, Li Y X, Wang B F, Beier R C, Lei H T, Wang H, Shen Y D, Sun Y M. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 647(1): 90 ~ 96
19 Shen Y D, Zhang S W, Lei H T, Wang H, Xiao Z L, Jiang Y M, Sun Y M. *Molecules*, **2008**, 13(9): 2238 ~ 2248

Development of Broad-specificity Immunoassay for Detection of *O*,*O*-Dimethyl Organophosphorus Pesticides

LI Yong-Xiang[1], XU Zhen-Lin[1], WANG Hong[1], LEI Hong-Tao[1],
SUN Yun-Ming[1], SHEN Dan[2], YANG Jin-Yi[1], SHEN Yu-Dong*[2]
[1](*College of Food Science*, *South China Agricultural University*, *Guangzhou* 510642)
[2](*Guangzhou Animal Health Inspection Institute*, *Guangzhou* 510440)

Abstract Taking *O*,*O*-dimethyl organophosphorus pesticides as targets, a series of haptens were designed and synthesized. Four antibodies with broad-specificity to *O*,*O*-dimethyl organophosphorus pesticides were produced. Results showed that the broad specificity of antibody produced by hapten with unsaturated alkane arm was better than that of the haptens with amide bond on the benzene ring. The sensitivity of ELISA to *O*,*O*-dimethyl organophosphorus pesticides could be significantly improved by using the coating antigen with a characteristic substructure moiety of the targets. Under optimized conditions, eight *O*,*O*-dimethyl organophosphorus pesticides were detected using indirect competitive ELISA. The limits of detection (LODs) are lower than the MRLS standard requirements with the LOD ranging from 2.6 to 104 μg/kg. The recoveries of vegetable samples match the level of gas chromatography with the average recovery of 73.9% – 121.4% and average RSD 10.6% – 18.4% for lettuce, average recovery of 80.4% – 121.2% and average RSD 13.5% – 24.4% for pakchoi.

Keywords Organophosphorus pesticides; Broad-specificity; Heterology coating; Enzyme-linked immunosorbent assay

(Received 1 April 2010; accepted 18 June 2010)