

• 研究论文 •

均匀设计在 ELISA 分析方法条件优化实验中的应用

王春梅¹, 刘毅华¹, 李贤宾¹, 黄国洋², 朱国念^{* 1}

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029; 2. 浙江省农药检定管理所, 杭州 310020)

摘要:以对硫磷为对象, 通过与常规方法相比较, 对均匀设计法在 ELISA 分析方法条件优化实验中应用的适用性进行了研究。采用常规方法对对硫磷 ELISA 分析方法条件优化的结果为: 甲醇体积分数为 5%, 离子强度 0.50 mol/L 和 pH 7.40 此时建立的 ELISA 方法 IC_{50} 值为 89.17 ng/mL, IC_{20} 值为 12.49 ng/mL。而采用均匀设计法对对硫磷 ELISA 分析方法条件进行优化, 并对实验结果进行多元二项式统计回归, 预测了最佳条件组合的取值, 并进行了 ELISA 实验验证, 结果表明: 当甲醇体积分数为 10%、离子强度为 2.00 mol/L、pH 为 5.00 时, 建立的 ELISA 方法的 IC_{50} 值为 9.96 ng/mL, IC_{20} 值为 1.21 ng/mL。将两种方法应用于 5 种性质不同的环境土壤中对硫磷的检测, 结果表明, 采用均匀设计法进行 ELISA 分析方法条件优化实验快速简便, 能够筛选得到最优条件组合, 建立的 ELISA 方法具有更好的广谱性, 能够更广泛地应用于基质差异较大的同类样品检测。

关键词: ELISA; 均匀设计; 农药; 残留; 土壤

中图分类号: R466.61; TQ450.263

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)04-0437-06

The Application of Uniform Design for the Optimization of ELISA Method

WANG Chun-mei¹, LU Yi-hua¹, LI Xian-bin¹, HUANG Guo-yang², ZHU Guo-nian^{* 1}

(1. Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029 China;

2. Institute for the Control of Agrochemicals, Zhejiang Province, Hangzhou 310020 China)

Abstract The application of uniform design (UD) for the optimization of ELISA method for determining parathion in soil was investigated and compared with the regular optimization method. Firstly, the regular method for the optimization of ELISA showed the optimal conditions were 5% methanol, ionic strength 0.50 mol/L and pH 7.40. Under these conditions, the method showed the IC_{50} and IC_{20} were 89.17 ng/mL and 12.49 ng/mL, respectively. Further, the uniform design was introduced into the optimization of ELISA and the results were computed by statistical method. Then the forecasting model was brought out and the optimized conditions were recommended. The results showed the optimal conditions were with 10% methanol, ionic strength 2.00 mol/L and at pH of 5.00. The IC_{50} and IC_{20} of this UD optimized method were 9.96 ng/mL and 1.21 ng/mL, respectively. Both two optimized methods were applied for the residue determination of parathion in five types of soils. The results showed the application of uniform design for the optimization of ELISA method was quick and easy compared with the regular method. Moreover, the optimized conditions from the uniform design

收稿日期: 2008-05-14; 修回日期: 2008-07-31

作者简介: 王春梅 (1982-), 女, 博士研究生, 主要从事农药残留与免疫化学分析研究, E-mail: wchunm@163.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 朱国念 (1957-), 男, 浙江诸暨人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药学相关领域的研究, 联系电话: 0571-86971220, E-mail: zhuguan@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30370944); 教育部博士点基金项目

method contributed to a more broad-specific method which could be applied for parathion determination in complex samples with different matrix effects

Key words ELISA; uniform design; pesticide residue; soil

免疫分析 (Immunoassay, IA) 是基于抗原抗体之间的特异性与可逆性结合反应对化合物进行检测的分析技术。由于其无需昂贵的仪器设备、操作简便快捷, 因而在农产品农药残留现场筛选和大量样本的快速监测中显示出独特优势。到目前为止, 国内外已开发了近百种农药的免疫化学分析方法^[1~7]。AOAC (Association of Analytical Communities) 组织推荐了 40 余种农药的商品化试剂盒^[8], 其中酶联免疫分析法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 应用最为广泛。在 ELISA 分析技术开发中, 面临的最大问题就是不同基质效应 (matrix effect) 对方法的灵敏度和特异性影响很大^[9], 致使采用标准样品建立的方法的灵敏度和特异性都大幅度降低^[10]。这也是造成目前各种商品化试剂盒适用的检测对象类型较少的主要原因。因此在免疫分析方法建立过程中往往需要采用一些因素 (pH、离子强度、溶剂等) 来代表不同基质的影响, 对方法进行条件优化, 以建立能够广泛应用于含各种基质的样品中残留农药检测的方法。由于优化实验往往涉及到多因素, 若对全部因素的可能组合均进行研究则工作量太大, 因此研究者均采用先固定一个因素条件, 然后变化其他因素来进行实验^[11~14]。但这样可能导致最优因素组合的漏筛。因此需要对涉及多因素影响的优化实验进行科学、合理且快速的实验设计。当考察因素和水平数 (因素的取值) 少于 4 时, 常用的实验设计方法有正交实验设计、回归正交实验设计、旋转设计、D-最优设计等。但由于 ELISA 条件优化实验涉及的因素和因素水平数往往大于 4, 采用前面提到的实验设计方法不能达到快速筛选的要求, 而我国著名数学家方开泰教授和王元院士提出的均匀设计法^[15]则能够实现多因

素水平条件筛选实验的快速、科学进行, 同时获得理想的结果。本文以对硫磷为对象, 对均匀设计在 ELISA 分析方法条件优化实验中的应用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 药剂和试剂

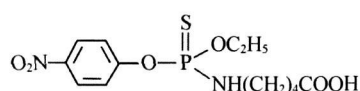
对硫磷 (parathion) 标准品 (99.6%, 农业部农药检定所); 酶标二抗 (山羊抗兔 IgG-HRP, 上海华美生物工程公司); 碳酸盐缓冲溶液 (CBS, 0.01 mol/L, pH 9.60); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 7.40); 洗涤液 (PBST, 含体积分数为 0.05% 吐温-20 的 PBS, pH 7.40); 底物溶液: 每 25 mL 0.05 mol/L, pH 5.00~5.50 的柠檬酸·磷酸氢二钠缓冲溶液, 临用前加入 10 mg 邻苯二胺 (OPD), 溶解后加入 10 μ L 30% H₂O₂, 混匀待用; 终止液: 2 mol/L 硫酸; N, N-二甲基甲酰胺 (DMF) 等试剂均为分析纯。

1.2 仪器

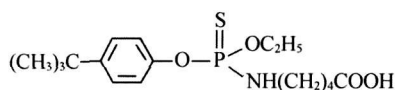
DEM-III 自动酶标洗板机 (北京拓普分析仪器有限公司); 氮气吹蒸装置 (杭州雪中炭恒温技术有限公司); MM-1 型微量振荡器 (江苏省姜堰市康泰医疗器材厂); 旋涡混合器 WH-861 (太仓市科教器材厂); 酶标仪 Model 680 (BIO-RAD 公司); WHS 型智能恒温恒湿箱 (宁波江南仪器厂); 96 孔聚苯乙烯酶标板 (COSTAR, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 半抗原设计和抗体制备 抗体为浙江大学农药与环境毒理研究所制备的多克隆抗体^[16], 免疫半抗原 (I) 和包被半抗原 (II) 结构如下:



(I)



(II)

1.3.2 异源直接竞争 ELISA 分析 采用异源直接竞争 ELISA 法, 其中包被半抗原结构如 (II)。

反应模式为酶标抗体法, 酶标抗体制备采用改良的过碘酸钠法^[18]。采用方阵实验法测定包被抗原

和酶标抗体的稀释度, 选择 OD_{490nm} 值约为 1.00 以抗原和酶标抗体用量较少的浓度组合为抗原 / 抗体的最适工作浓度。该工作浓度下, 将包被半抗原-OVA 以 CBS 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯酶标板, 封闭, 加入预先以 PBS 稀释的 Ab-HRP 和系列浓度的对硫磷标样各 50 μ L / 孔, 振荡后温育, 底物显色, 测定各孔 OD_{490nm} 值。绘制半对数标准曲线, 计算 IC_{20} 、 IC_{50} 与 IC_{80} 值。

1.3.3 常规方法优化 ELISA 分析条件 选择目前 ELISA 条件优化实验中常见的 3 种考察因素——溶剂 (甲醇、丙酮、乙腈)、离子强度和 pH 进行研究, 每种因素设计 5 个水平。

(1) 溶剂的优化: 固定离子强度 (常用 PBS 溶液的离子强度为 0 mol/L) 和 pH 值 (pH 7.40), 设置溶剂的 5 个因素水平为 0% (文中百分浓度均为体积分数)、5%、10%、15% 和 20%, 采用酶标抗体的 ELISA 方法建立针对对硫磷的标线, 根据空白孔的 OD 值和标准曲线 (下称标线) 的 IC_{50} 值选择 3 种溶剂条件下最优的溶剂及其因素水平。

(2) 离子强度的优化: 固定溶剂及其水平 (前面挑选出的最优溶剂和水平), 同时固定 pH 值 (pH 7.40), 设置离子强度的 5 个因素水平为 0、0.50、1.00、1.50、2.00 mol/L, 采用酶标抗体的 ELISA 方法建立针对对硫磷的标线, 根据空白孔的 OD 值和标线的 IC_{50} 值选择最优的离子强度水平。

(3) pH 的优化: 固定溶剂及其水平, 同时固定离子强度, 设置 pH 的 5 个因素水平为 5.4、6.00、7.4、8.00 和 9.00 采用酶标抗体的 ELISA 方法建立针对对硫磷的标线, 根据空白孔的 OD 值和标线的 IC_{50} 选择最优的 pH 水平。

1.3.4 均匀设计方法优化 ELISA 分析条件 实验分为甲醇组、丙酮组和乙腈组, 采用 DPS 进行 3 因子 5 水平的均匀设计, 根据均匀设计表, 将 3 个因子的不同水平组合进行相应的 ELISA 实验, 根据空白孔的 OD 值和标线的 IC_{50} 、 IC_{10} 值选择实验最优处理组。并采用 DPS 对结果进行统计运算, 寻找理论最优条件组。

1.3.5 添加回收率实验 为比较常规方法和均匀设计方法建立的 ELISA 方法对实际样品的检测能力, 采用 5 种土壤样品进行了添加回收率实验。将土壤样品风干, 过 60 目筛 (筛孔直径 2.46 mm), 筛下样品按四分法分样后称取 2 g 以 2 mL 乙腈振荡提取 1 min 离心 (4 000 r/min) 5 min 吸取上

清液 1 mL, 氮气吹干, 加入一定量的 PBS (含体积分数为 10% 的甲醇), 旋涡震荡 1 min, 用于 ELISA 检测。

2 结果与分析

2.1 常规方法对 ELISA 实验条件优化的处理结果

2.1.1 溶剂条件的优化 结果见表 1。甲醇处理组中, 随着甲醇含量的增加, OD_{max} 值变化不明显, 而 ELISA 方法标线的 IC_{50} 值随着甲醇含量的增加呈现先减少后增大的现象, 由于甲醇含量 5% 和 10% 的两个处理建立的 ELISA 方法的 IC_{50} 、 OD_{max} 相近, 但 5% 甲醇处理标线的斜率 (14.57) 大于 10% 甲醇的斜率 (9.38), 而较大的斜率代表此标线更适合用于样品定量检测, 所以选定甲醇含量为 5%。

丙酮和乙腈处理组中, 随着溶剂含量的增加, OD_{max} 值减少, 但均小于 1.00 考虑到建立 ELISA 方法时常选 $OD = 1.00$ 左右的抗原、抗体量组合为工作浓度, 因此该处理不适合用于建立 ELISA 标线。另外, 对比甲醇、丙酮和乙腈 3 种溶剂处理组的 IC 结果, 可以看出 5% 甲醇处理组 ELISA 方法的灵敏度均高于其他两种溶剂处理的结果, 尽管 20% 丙酮处理的 IC_{50} 为 66.18 ng/mL, 但其标线的斜率为 6.47, 故此标线无应用性。

2.1.2 离子强度条件的优化 根据溶剂条件优化结果, 固定溶剂为 5% 甲醇, 在 pH 7.40 下对离子强度条件进行优化, 结果见图 1。随着离子强度从 0 增大到 0.50 mol/L, OD_{max} 值从 1.40 降低到 0.87, 此后 OD_{max} 值在 0.90 附近波动。而 IC_{50} 值在 0.50 mol/L 离子强度时达到最小值, 为 89.17 ng/mL, 此后随离子强度的增大而增大。最后选定优化后的离子强度为 0.50 mol/L, 此时建立的 ELISA 方法的标线方程为: $y = 15.26 \ln(x) - 18.53$, $R^2 = 0.98$ 。

2.1.3 pH 条件的优化 在 5% 甲醇、离子强度 0.50 mol/L 下对 pH 条件进行优化, 结果见图 2。随着 pH 值的增大, OD_{max} 从 1.63 降低到 0.45; 而 IC_{50} 值在高 pH 值时较大, 较低 pH 时偏小, 最小值出现在 pH 7.40 时, 为 89.17 ng/mL。综合溶剂和离子强度的结果, 采用常规方法对对硫磷 ELISA 分析方法条件优化的结果为 5% 甲醇、离子强度 0.50 mol/L 和 pH 7.40。此时建立的 ELISA 方法的标线方程是:

表 1 常规方法的溶剂条件优化结果

Table 1 The results of optimization of organic solvents by regular method

溶剂 Solvent	标线方程 Regression equation	R ²	IC ₂₀ /(ng/mL)	IC ₅₀ /(ng/mL)	IC ₈₀ /(ng/mL)	OD _{max}
甲醇 Methanol						
0%	$y = 18.25\ln(x) - 41.33$	0.98	28.80	149.0	771.2	1.56
5%	$y = 14.57\ln(x) - 17.23$	0.97	12.86	100.8	789.4	1.40
10%	$y = 9.38\ln(x) + 6.29$	0.98	4.31	105.5	2580	1.57
15%	$y = 10.00\ln(x) - 3.47$	0.97	8.45	129.3	1978	1.77
20%	$y = 9.99\ln(x) - 10.32$	0.96	20.78	418.1	841.2	1.62
丙酮 Acetone						
0%	$y = 18.25\ln(x) - 41.33$	0.98	28.80	149.0	771.2	1.56
5%	$y = 9.14\ln(x) - 3.25$	0.96	12.73	339.1	9033	0.75
10%	$y = 9.34\ln(x) - 9.59$	0.98	23.76	589.3	1.462×10^4	0.76
15%	$y = 9.61\ln(x) - 0.29$	0.99	8.27	187.9	4267	0.50
20%	$y = 6.47\ln(x) + 22.88$	0.95	0.64	66.18	6844	0.41
乙腈 Acetonitrile						
0%	$y = 18.25\ln(x) - 41.33$	0.98	28.80	149.0	771.2	1.56
5%	$y = 20.52\ln(x) - 63.56$	0.99	58.66	253.0	1091	1.01
10%	$y = 10.48\ln(x) - 11.23$	0.97	19.66	343.8	6013	0.70
15%	$y = 13.77\ln(x) - 35.34$	0.98	55.57	490.6	4331	0.45
20%	$y = 3.87\ln(x) + 7.03$	0.90	28.49	6603×10^4	1.530×10^8	0.48

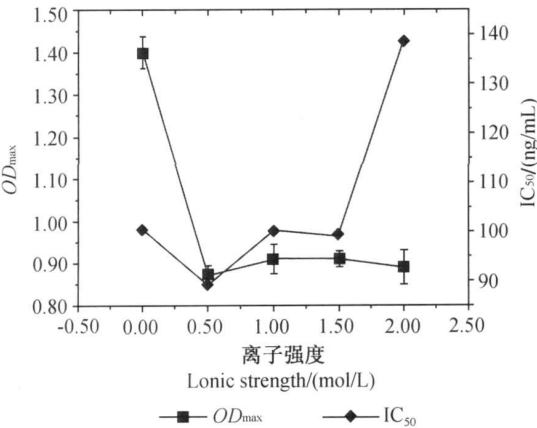


图 1 常规方法的离子强度条件优化结果

Fig 1 The optimized results of ionic strength by common method

$y = 15.26\ln(x) - 18.53$, $R^2 = 0.99$, $IC_{50} = 89.17$ ng/mL, $IC_{20} = 12.49$ ng/mL, $IC_{80} = 636.7$ ng/mL, $OD_{max} = 0.87$.

2.2 均匀设计对 ELISA 实验条件优化的处理结果

采用 DPS 的均匀设计模块, 对 3 种有机溶剂 (甲醇、丙酮、乙腈)、离子强度和 pH 进行了 3 因素 5 水平的实验设计, 最后获得一个进行 5 次处理的

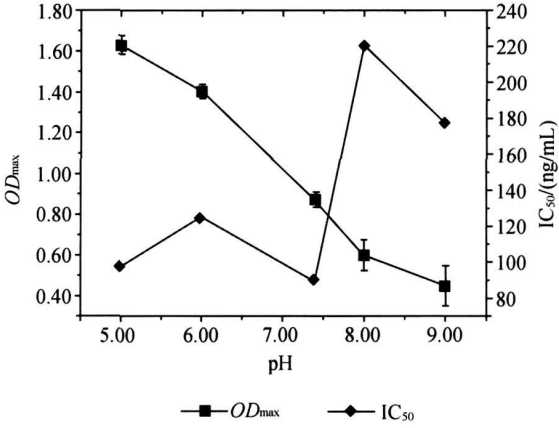


图 2 常规方法的 pH 条件优化结果

Fig 2 The optimized results of pH by regular method

均匀设计实验方案。按照均匀设计表中 3 种因素的水平组合进行 ELISA 实验, 均匀设计表和 ELISA 实验结果见表 2。从中可以看出, 3 种溶剂之间的比较结果与常规方法进行条件优化时的实验现象相似, 都是甲醇处理组的结果优于丙酮和乙腈处理组; 而在甲醇组的 5 个处理中, 又以 N1 处理结果最好 (通过 IC_{50} 值的比较), 其中 3 个因素的条件组合为 5% 甲醇、离子强度 0.50 mol/L

和 pH 5.00 建立的 ELISA 方法的 IC_{50} 值为 76.60 ng/mL, OD_{max} 为 1.60。进一步对甲醇处理组的均匀设计结果进行统计回归, 得到甲醇百分含量 (X_1)、离子强度 (X_2) 和 pH 值 (X_3) 3 个因素与 IC_{50} (Y_1) 和 OD_{max} (Y_2) 的二次多项式方程为:

$$Y_1 = -1.217 - 47.82X_2 + 397.9X_3 - 26.85X_3^2, R^2 = 0.99$$
$$Y_2 = 2.30 - 1.50X_2 - 0.096X_3 + 0.21X_2 \times X_3, R^2 = 0.99$$

两个方程经 F 检验, P 均小于 0.05, 说明方程达到显著水平 ($\alpha = 0.05$), 密切相关, 该方程可以作为 IC_{50} 值和 OD_{max} 的估算模型。对 IC_{50} 方程求最小值 $Y_{1(m in)}$, 解得当 $X_1 = 0.10$, $X_2 = 2$, $X_3 = 5$ 时, $Y_{1(m in)} = 5.31$, 代入 Y_2 方程, 求得 $Y_2 = 0.924$ 。即

当甲醇含量为 10%, 离子强度为 2.00 mol/L, pH 为 5.00 时, 建立的 ELISA 方法的 IC_{50} 值为 5.31 ng/mL, 此时 $OD_{max} = 0.92$ 。为验证均匀设计方法的研究结果, 对得出的 3 个因素条件组合进行 ELISA 实验, $OD_{max} = 0.95$ 。建立标线方程为:

$$y = 14.25 \ln(x) + 17.24, R^2 = 0.99, IC_{30} = 9.96 \text{ ng/mL}, IC_{20} = 1.21 \text{ ng/mL}, IC_{80} = 81.74 \text{ ng/mL}。$$

结合 ELISA 实验结果板间差异、酶标仪读板、系统误差等客观因素, 比较预测值和实际值, 可以看出预算与实际结果相符合。均匀设计方法得出的优化条件组合结果更优于常规方法结果。均匀设计方法只需 15 次实验, 而常规方法单溶剂筛选一项就进行了 15 次实验, 因此均匀设计方法效率大大高于常规方法。

表 2 均匀设计表和 ELISA 实验结果

Table 2 The uniform designing table and the ELISA results

处理 Treatment	溶剂浓度 Solvent concentration (%, V/V)	离子强度 Ionic strength (mol/L)	pH	OD _{max}			IC ₅₀ /(ng/mL)		
				甲醇	丙酮	乙腈	甲醇	丙酮	乙腈
				Methanol	Acetone	Acetonitrile	Methanol	Acetone	Acetonitrile
N 1	5.00	0.50	5.00	1.60	0.62	0.88	76.60	221.6	259.8
N 2	15	0.00	8.00	1.55	0.36	0.44	248.3	132.4	1325
N 3	10	2.00	9.00	2.23	0.57	1.41	93.36	926.0	797.7
N 4	0	1.00	7.40	1.62	1.62	1.62	207.3	207.3	207.4
N 5	20	1.50	6.00	1.38	0.22	0.71	132.9	824.7	2928

2.3 样品检测结果

采用常规方法和均匀设计方法选定的 ELISA 方法条件, 分别对 5 种不同性质的土壤样品中的对硫磷进行检测, 土壤的理化性质 (由浙江省宁波市农产品质量检测中心提供) 及检测结果见表 3。从结果看, 常规方法挑选出的优化条件组合对基质含量不同的 5 种土壤的检测能力相对没有均匀设计法的结果稳定, 尤其是在低浓度时最为明显, 如合肥土中添加 10.00 ng/mL 对硫磷标样时, 常规方法的回收率是 47.50%, 而均匀设计方法的回收率是 97.30%。对比分析两种方法的添加回收率, 可以看出均匀设计方法对 pH < 7.00 且有机质含量和阳离子交换量较大的 3 种土壤 (合肥土、杭州土和成都土) 中对硫磷的检测能力强于常规方法, 这可能与均匀设计方法选定的优化条件组合为 pH 5.00, 离子强度为 2.00 mol/L 有关。土壤基质与选定的 ELISA 条件相近, 使得方法应用于这些样品检测时受基质效应的影响较少; 在厦门土中, 两种方法的检测能力大致相当; 而在哈尔滨土中, 常规方法的检测能力略优于均匀设计法。

这与前面提到的土壤基质与 ELISA 条件之间的差异有关, 哈尔滨土的 pH (8.06) 更接近常规方法选定的 pH 7.40, 但哈尔滨土中有机质和阳离子交换量较高, 这也可能是造成两种方法在低浓度时检测能力相当的原因。

3 结论和讨论

在农药 ELISA 分析方法初步建立后, 常常需要对各种条件 (如离子强度、pH、有机溶剂等) 进行优化筛选, 即进行 ELISA 分析方法的条件优化实验以获得最佳条件组合, 使得最终建立的 ELISA 方法能够应用于比较广泛的农产品和环境样品的检测。采用常规方法进行实验比较繁琐, 往往导致不同研究者对同一个农药 ELISA 分析方法的优化结果不一致, 甚至找不到最佳条件组合。而均匀设计在实验范围内考虑实验点均匀散布, 以求通过最少的实验来获得最多的信息, 因而其实验次数比正交设计明显减少, 使均匀设计特别适合于多因素多水平的实验和系统模型完全未知的情况。本研究将均匀设计引入到 ELISA 分析方

表 3 五种受试土壤的理化性质和添加回收率

Table 3 The physicochemical parameters of and recovery of parathion the five kinds soil

土壤 Soil	pH	有机质 Organic matter (%)	阳离子交换量 Cation exchange capacity /(mol/kg)	土壤机械组成 Soilm echanical cm position(%)		添加水平 Fortified level /(mg/kg)	回收率 ±标准差 Recovery (%) ±SD	
				> 1 mm	< 1 mm		常规方法	均匀设计方法
							Regular	UD method
合肥土 Hefei soil	5.24	1.32	33.42	40.91	59.14	10.00	47.52±2.51	97.28±3.02
						20.00	58.43±3.22	94.29±5.18
						50.00	75.86±2.54	90.53±4.94
杭州土 Hangzhou soil	5.82	1.94	36.77	41.47	58.53	10.00	56.74±6.49	96.37±4.22
						20.00	85.64±7.34	94.85±6.14
						50.00	113.57±6.54	99.16±5.12
成都土 Chengdu soil	6.02	1.67	40.62	42.22	57.79	10.00	39.75±6.68	94.58±4.12
						20.00	79.46±3.42	91.64±6.51
						50.00	89.10±5.77	96.33±3.25
厦门土 Xiamen soil	6.84	2.08	27.14	19.48	80.54	10.00	100.08±6.41	114.03±6.59
						50.00	95.50±2.87	115.47±7.56
						20.00	101.27±3.49	120.82±9.95
哈尔滨土 Harbin soil	8.06	2.62	45.58	24.72	75.26	10.00	60.14±3.62	65.76±6.63
						20.00	86.61±7.22	72.02±3.43
						50.00	116.86±6.05	74.81±5.21

法条件优化实验中,与常规方法的结果相比,均匀设计方法建立的 ELISA 方法的检测能力更具有广谱性,建立的对硫磷的 ELISA 优化方法能够较好地 对 5 种性质不同的土壤进行农药残留检测,方法的灵敏度和特异性基本都高于常规方法,而且更加快速、简便。

参考文献:

[1] MANCLUS J J, RMO J, MONTOYA A. Development of Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Chlorpyrifos [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 4052-4070.

[2] KM H J, SHELVER W L, LI Q X. Monoclonal Antibody-based Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Imidacloprid [J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 509: 111-118.

[3] ZHANG Q, SUN Q, HUA B S, et al. Development of a Sensitive ELISA for the Analysis of the Organophosphorous Insecticide Fenthion in Fruit Samples [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1278-1284.

[4] LEE W Y, LEE E K, KM Y J et al. Monoclonal Antibody-based Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the Detection of the Organophosphorous Insecticide Isofenphos [J]. Anal Chim Acta, 2006, 557 (1-2): 169-178.

[5] ABAD A, MORENO M J, MONTOYA A. A Monoclonal Immunoassay for Carbofuran and its Application to the Analysis of Fruit Juices [J]. Analytica Chimica Acta, 1997, 347: 103-110.

[6] BANKS K E, HERNANDEZ S. Evaluation and Validation of Commercially Available Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA s) Specific for Atrazine, Chlorpyrifos and Diazinon in Aqueous Phase [J]. Talanta, 2003, 61: 257-265.

[7] WANG Chun-mei (王春梅), CHENG Jing-li (程敬丽), LIU Y +hua (刘毅华), et al. 拟除虫菊酯类农药酶免疫分析方法

研究进展 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2008, 10 (1): 15-22.

[8] GUI Wen-jun (桂文君). Industrial Technique for Pesticide Rapid Test ELISA Kit-preparation of Triazophos and Carbofuran ELISA Kits (农药残留 ELISA 速测试剂盒产业化技术研究——三唑磷、克百威 ELISA 试剂盒研制) [D]. Hangzhou (杭州): Zhejiang University (浙江大学), 2007.

[9] NAKATA M, FUKUSHIMA A, OHKAWA H. A Monoclonal Antibody-based ELISA for the Analysis of the Insecticide Flucythrinate in Environmental and Crop Samples [J]. Pest Manag Sci, 2001, 57: 269-277.

[10] KM Y J, KM Y A, LEE Y T, et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Fenitrothion: Influence of Hapten Conformation and Sample Matrix on Assay Performance [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 591: 183-190.

[11] GAO H B, LING Y, XU T, et al. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Insecticide Cyhalothrin [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 5284-5291.

[12] LIU X J, YAN C R, DONG J et al. Poly- and Monoclonal Antibody-Based ELISAs for Fipronil [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55 (2): 226-230.

[13] ZHU G N, JIN M J, GUI W J et al. Development of a Direct Competitive Enzyme-linked Immunoassay for Carbofuran in Vegetables [J]. Food Chem, 2008, 107: 1737-1742.

[14] LEE H J, SHAN G M, WATANABLE T, et al. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Pyrethroid Deltamethrin [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 5526-5532.

[15] FANG Kai-tai (方开泰). Uniform design (均匀设计与均匀设计表) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1994.

[16] LIU Y H, JIN M J, GUI W J et al. Hapten Design and Indirect Competitive Immunoassay for Parathion Determination: Correlation with Molecular Modeling and Principal Component Analysis [J]. Anal Chim Acta, 2007, 591: 173-182.

(Ed JIN SH)