

抗吡虫啉单克隆抗体的制备及鉴定

李刚^{1,2}, 纪宪勇³, 钱国良^{1,2}, 华修德^{1,2}, 秦娜^{1,2}, 王杰³, 刘凤权^{1,2}

1 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095

2 南京农业大学 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095

3 南京大学化学化工学院, 南京 210093

摘要: 为制备灵敏度高, 特异性强的抗吡虫啉单克隆抗体, 建立经济、快速、准确的吡虫啉残留免疫学分析方法, 采用分子模拟技术分析吡虫啉及其类似农药的电荷分布后, 选择 1-[6-(2-羧乙硫基-3-吡啶)甲基]-N-硝基-2-咪唑啉亚胺 (H1) 作为免疫半抗原, 1-(6-氯-3-吡啶甲基)-3-羧丙基-N-硝基-2-咪唑啉亚胺 (H2) 作为包被半抗原, 利用 NHS 酯法将 H1 和 H2 分别与牛血清蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 偶联合成免疫原与包被原。免疫 BALB/c 小鼠后, 采用常规杂交瘤技术共获得 2 株稳定分泌抗吡虫啉单克隆抗体的细胞株 2F11/A9 和 2G6/G12, 其分泌的抗体类型分别为 IgG3 和 IgG1, 两细胞株的腹水抗体效价均达到了 1:128 000, IC₅₀ 分别为 5.3 ng/mL 和 28.3 ng/mL, 检测限分别为 1.1 ng/mL 和 7.7 ng/mL, 两种抗体与 6 种吡虫啉的结构类似物均无明显的交叉反应。抗吡虫啉单抗的制备为吡虫啉残留免疫学检测方法的建立及免疫检测产品的研发奠定了基础。

关键词: 吡虫啉, 分子模拟, 单克隆抗体, 酶联免疫吸附法

Production and identification of monoclonal antibodies against pesticide imidacloprid

Gang Li^{1,2}, Xianyong Ji³, Guoliang Qian^{1,2}, Xiude Hua^{1,2}, Na Qin^{1,2}, Jie Wang³, and Fengquan Liu^{1,2}

1 College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests (Nanjing Agricultural University), Ministry of Education, Nanjing 210095, China

3 School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: To produce high-affinity monoclonal antibodies against pesticide imidacloprid, we synthesized the haptens 1-[(6-Carboxylethylthio-3-pyridinyl) methyl] -N-nitro-imidazolidinimine (named as H1) and 1-[(6-Chloro-3-pyridinyl) methyl]-3-carboxylpropyl-N-nitro-2-imidazolidinimine (termed as H2). And then the haptens were coupled to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) for immunogen (H1-BSA) and coating antigen (H2-OVA) respectively by NHS ester method. BALB/c mice were immunized with H1-BSA conjugate. We obtained two hybridoma cell lines 2F11/A9 and 2G6/G12 secreting antibody specific for

Received: August 27, 2010; **Accepted:** December 27, 2010

Supported by: National Key Technology R&D Program (No. 2009BADB9B03), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10Z447).

Corresponding author: Fengquan Liu. Tel: +86-25-84396726; E-mail: fqliu20011@sina.com

国家科技支撑计划 (No. 2009BADB9B03), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10Z447) 资助。

imidacloprid from the conventional hybridoma technology. The result showed that the subtypes of obtained monoclonal antibodies were IgG3 and IgG1, respectively, and the titers of ascites were up to 1:128 000. The indirect competitive ELISA indicated the IC_{50} values of 5.3 and 28.3 ng/mL with detection limits of 1.1 ng/mL and 7.7 ng/mL, respectively. Two monoclonal antibodies had no apparent cross reactivity with six analogous compounds. Thus, two prepared monoclonal antibodies had a very high affinity and specificity, and it could be used to develop ELISA for rapid determination of imidacloprid residue and laid a solid foundation for research and development of products for immunoassay.

Keywords: imidacloprid, molecular modeling, monoclonal antibodies, ELISA

吡虫啉, 1-(6-氯-3-吡啶甲基)-N-硝基-2-咪唑啉亚胺, 属于新型烟碱类杀虫剂, 中等毒性, 通过作用于昆虫的乙酰胆碱受体而使害虫麻痹, 最终死亡。近年来, 吡虫啉已经广泛应用于水稻、棉花、茶树、大豆、烟草等作物来防治飞虱、介壳虫、白粉虱等农业害虫^[1]。良好的防治效果使其在农业生产中被大量使用, 但是不当使用对环境对人类健康造成了威胁^[2-3], 因此有必要对农产品中吡虫啉残留进行检测分析。

目前对吡虫啉农药的残留分析大多采用气相色谱法 (GC) 和高效液相色谱法 (HPLC)^[4-5], 这些方法需要使用昂贵的仪器设备, 对样品前处理复杂, 操作人员必须经过专业培训, 所以这些方法并不适合样品的批量筛选, 且检测费用较高。而免疫分析方法的发展为快速大批量样本筛选和现场检测提供了可能, 并且操作简单, 检测费用低。国内外已经有很多关于农药残留免疫分析方法的报道^[6-12]。

以单克隆抗体为基础的吡虫啉免疫分析技术, 国外已经有相关的文献报道^[10], 但对于半抗原的设计采用的是“试错法”^[13], 该方法工作量大、偶然性强。本研究利用分子模拟技术选择合适的半抗原用于抗吡虫啉单克隆抗体的制备研究, 获得了特异性强、灵敏度高的抗吡虫啉单克隆抗体, 为后续吡虫啉残留免疫学检测方法的建立及相关免疫检测产品的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 生物材料

6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 购于扬州大学比较

医学中心; 小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

吡虫啉原药 (含量在 95% 以上) 由江苏农药研究所提供; 分析级试剂购于上海试剂三厂; 吡虫啉及交叉反应中所用到的农药标准品、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、四甲基联苯胺 (TMB)、二环己基碳二亚胺 (DCC) 均为 Sigma 公司产品; 杜氏改良的恩格尔基础培养基 (DMEM)、HAT 液 50×(氨基嘌呤、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸) 和 HT 液 100×(次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸) 均为美国 Gibco 产品; 小牛血清购自兰州民海生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 抗体类型鉴定试剂盒购自美国 Envirologix 公司。

1.1.3 仪器

磁力搅拌器 (8522, 常州国华电器有限公司); 旋转蒸发器 (RE25285A, 上海顾材电光仪器厂); 分光光度计 (UV7504pc 型, 上海欣茂仪器公司); 倒置显微镜 (Olympus); 低温冰箱 (SIMENS 公司); 移液器 (德国 Eppendorf 公司); Esquire2LC00075 液质联用仪 (德国 Bruker 公司); DNM29602 型酶联检测仪 (美国 Thermo Electron 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Electron 公司); ELx405TM 型全自动洗板机 (美国 BioTek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分子模拟

为了制备出特异性强的抗吡虫啉抗体, 减小抗体与非目标分析物之间的交叉反应, 对吡虫啉、吡虫啉类似物以及拟合成的半抗原进行了分子模拟计算。分子模拟计算是在 ChemBio3D Ultra 11.0 及

HyperChem Release 7.5 软件中进行的, 先在 Chembio3D Ultra 11.0 中绘制出化合物的结构式, 并用 MM2 分子力场进行最小能量计算, 将计算后的结果导入 HyperChem Release 7.5 中, 用半经验分子轨道算法 (PM3) 对化合物进行优化, 最终获得相应化合物的电荷分布情况。

1.2.2 半抗原的合成

半抗原 1-[6-(2-羧乙硫基-3-吡啶)甲基]-N-硝基-2-咪唑啉亚胺 (H1) 的合成参照先前报道^[11]的方法进行合成 (图 1), 合成的化合物通过核磁共振进行结构鉴定。

半抗原 1-(6-氯-3-吡啶甲基)-3-羧丙基-N-硝基-2-咪唑啉亚胺 (H2) 的合成参照先前报道^[12]的方法进行合成 (图 1)。区别在于将先前合成方法中的 6-溴己酸乙酯改为 4-溴丁酸乙酯。合成的化合物通过核磁共振进行结构鉴定。

1.2.3 人工抗原的合成路线

人工抗原的合成与鉴定: 利用 NHS 酯法^[14]将半抗原 H1 与 BSA 偶联成人工免疫原, 将半抗原 H2 与 OVA 偶联成人工包被原。合成的免疫原 (H1-BSA) 和包被原 (H2-OVA) 在磷酸缓冲液 (0.02 mol/L, pH 6.8) 中透析纯化, 经紫外扫描鉴定偶联成功后计算其结合比。

1.2.4 小鼠免疫及融合小鼠的选择

首次免疫: 取 6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 将

制备的免疫原用 PBS 稀释后与等体积弗氏完全佐剂混合, 充分乳化后, 经腹腔注射, 剂量为 100 μ g/只 (以蛋白浓度计); 加强免疫: 21 d 后, 取免疫原 (与首次免疫等剂量) 和等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后腹腔注射加强免疫 1 次, 以后每隔 14 d, 加强免疫 1 次, 共免疫 4 次。第 4 次免疫后 7 d, 采集小鼠血清, 用间接 ELISA 法 (包被原 H2-OVA 浓度为 4.88 mg/L) 选择融合小鼠。根据比值法^[14]测量小鼠效价, 选取效价最高的那只小鼠作为融合小鼠。融合前 3 d 对小鼠注射与首次免疫等剂量的免疫原。

1.2.5 细胞融合、筛选及抗体类型鉴定

取免疫小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞株 Sp2/0 (细胞数目比值约 10:1) 在 50% PEG1500 作用下进行常规融合。融合后 10 d 左右, 采用间接 ELISA 的方法 (包被原 H2-OVA 浓度为 4.88 mg/L, 一抗为细胞上清, 未融合孔的上清为阴性对照) 筛选阳性细胞株, 用有限稀释法进行细胞的单克隆化, 待阳性率达到 100% 后建株, 置于液氮罐中冻存。用美国 Envirologix 小鼠单克隆抗体类型鉴定试剂盒对杂交瘤细胞株所分泌的抗体进行类型鉴定, 具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.6 杂交瘤染色体核型的鉴定

参照先前的报道^[15], 取对数生长期杂交瘤细胞株 2F11/A9 和 2G6/G12 进行染色体核型鉴定。每株计数 5 个细胞, 记录染色体数目并算出平均值。

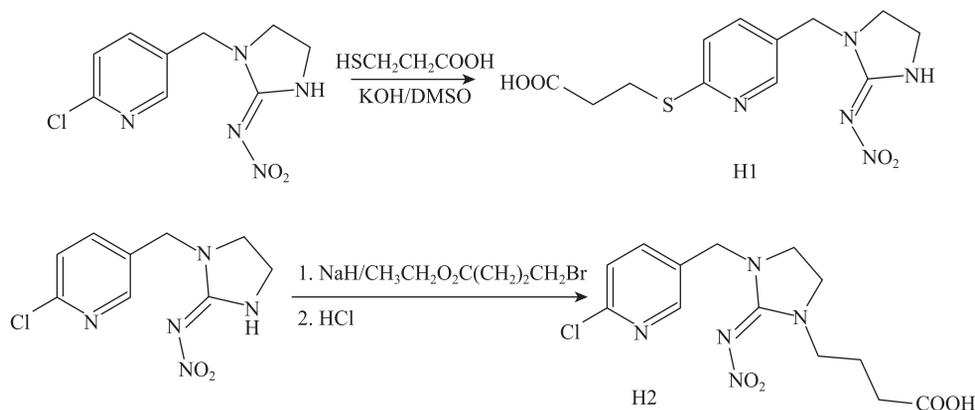


图 1 2 种半抗原 (H1、H2) 的合成路线图

Fig. 1 Synthesis routers for two haptens (H1, H2).

1.2.7 腹水的制备

取 6 周龄健康雌性 BALB/c 小鼠, 每只腹腔注射 0.5 mL 无菌石蜡油, 7~14 d 后, 每只小鼠腹腔分别注射 2×10^6 个杂交瘤细胞, 7~12 d 后, 待小鼠腹腔明显膨大后收集腹水, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 分装, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。间接 ELISA 方法测其效价 (包被原 H2-OVA 浓度为 4.88 mg/L, 一抗为腹水, 未免疫小鼠的血清为阴性对照)。

1.2.8 单克隆抗体的灵敏度测定

采用间接竞争 ELISA 方法: 包被原 H2-OVA 浓度为 4.88 mg/L, 一抗操作为加入系列浓度的农药标准溶液 (PBST 稀释, 含 5% 的丙酮) 25 μL , 再加入经 PBST 稀释的抗体 25 μL , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h。对 2F11/A9 和 2G6/G12 分泌的抗体进行灵敏度测定, 参照先前的报道^[14,16], 用 Origin 7.5 软件的四参数 logistic 函数模型对间接竞争 ELISA 的数据进行处理, 并拟合生成标准曲线。

1.2.9 单克隆抗体的特异性鉴定

采用间接竞争 ELISA 方法 (方法同 1.2.8 单克隆抗体的灵敏度测定), 在同等条件下建立吡虫啉农药及其结构类似物 (噻虫啉、啉虫脒、烯啶虫胺、噻虫嗪、噻虫胺、呋虫胺) 的标准曲线, 并计算 IC_{50} 值, 求出吡虫啉与各类似物的交叉反应率 = IC_{50} (吡虫啉) / IC_{50} (类似物) $\times 100\%$, 以此来评估单克隆抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 分子模拟结果及半抗原的选择

有研究者根据抗原-抗体之间的识别作用是基于由分子的电子特性所决定的原子空间排列及其相互作用, 提出了一个合理假说, 认为若化合物与偶联物抗原决定簇部分的相似度越高, 则该化合物与相应抗体之间的亲和力越好^[13]。吡虫啉及其结构类似物的分子模拟结果显示 (图 2), 拟合成的两种半抗原与目标分析物吡虫啉的电荷分布非常接近, 均可作为吡虫啉的半抗原, 但与吡虫啉相似的烟碱类

农药大都含有 α -氯代吡啶环结构 (图 2 中椭圆区域所示), 分子模拟的结果显示, 该结构在 4 种农药 (吡虫啉、噻虫啉、啉虫脒、烯啶虫胺) 中的电荷分布较为相似, 为了增强抗体的特异性, 减小抗体的交叉反应率, 应尽量使吡虫啉的特异结构 (图 2 中长方形区域所示) 暴露于大分子蛋白表面, 故选择半抗原 H1 作为免疫半抗原。然而, 根据 Hammock 的研究小组得出的间隔臂引入位点不同的异源分析可有效的提高抗体检测灵敏度的结论^[17], 选择半抗原 H2 作为包被半抗原。

2.2 半抗原结构鉴定

获得的半抗原 H1 和 H2 的核磁鉴定结果分别为:

H1: ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): 12.31 (1H, s, br. COOH), 8.92 (1H, s, NH), 8.37 (1H, s, Py-H), 7.55 (1H, d, $J=5.2\text{ Hz}$, Py-H), 7.27 (1H, d, $J=5.2\text{ Hz}$, Py-H), 4.39 (2H, s, CH_2), 3.60 (2H, t, $J=4.5\text{ Hz}$, CH_2), 3.46 (2H, t, $J=4.5\text{ Hz}$, CH_2), 3.30 (2H, t, $J=7.0\text{ Hz}$, CH_2), 2.62 (2H, t, $J=7.0\text{ Hz}$, CH_2)。

H2: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.37 (1H, s, Py-H), 7.73 (1H, d, $J=5.7\text{ Hz}$, Py-H), 7.39 (1H, d, $J=4.5\text{ Hz}$, Py-H), 4.49 (2H, s, CH_2), 3.81 (2H, t, $J=6.3\text{ Hz}$, CH_2), 3.62 (2H, t, $J=6.3\text{ Hz}$, CH_2), 3.44 (2H, t, $J=4.2\text{ Hz}$, CH_2), 2.48 (2H, t, $J=4.2\text{ Hz}$, CH_2), 1.98 (2H, m, CH_2)。

上述核磁结果显示两种合成产物分别与 H1 和 H2 的结构相吻合, 能够用于下一步的研究。

2.3 人工抗原偶联鉴定

经紫外扫描吡虫啉的半抗原、人工抗原、载体蛋白后发现偶联物的吸收谱图与相应的载体蛋白相比发生明显变化。偶联物的吸收峰形为载体蛋白与已经偶联上的半抗原叠加的结果 (图 3)。经计算, 半抗原 H1 与 BSA 结合比为 28 : 1, 半抗原 H2 与 OVA 的结合比为 11 : 1。

2.4 融合小鼠的选择

四免之后, 5 只小鼠中 1、2、5 号小鼠抗体效价为 1 : 64 000, 4 号小鼠抗体效价为 1 : 32 000, 3 号小鼠抗体效价为 1 : 128 000, 选取效价最高的 3 号小鼠进行融合。

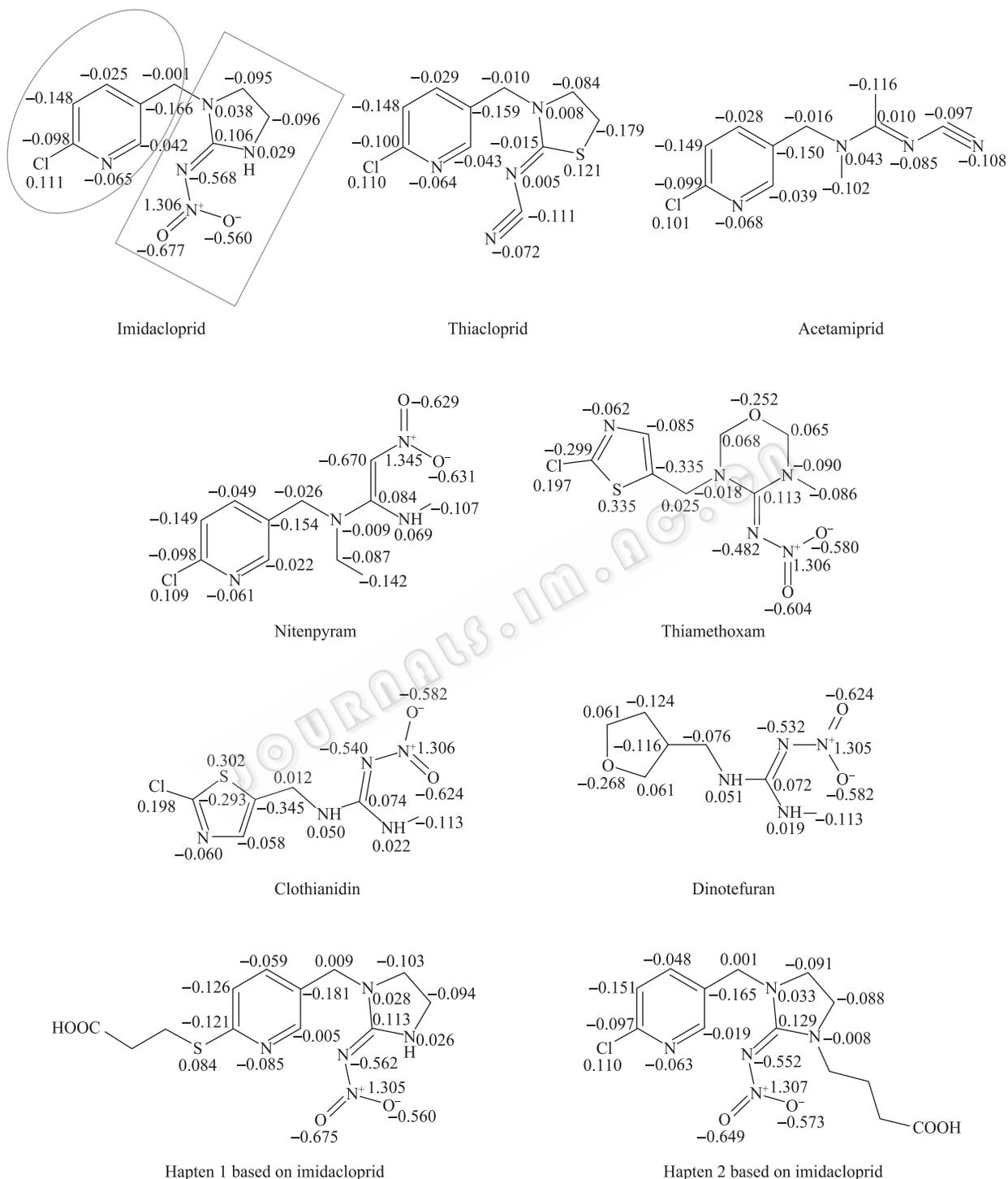


图 2 烟碱类杀虫剂及吡虫啉半抗原的电荷分布 (其中吡虫啉及半抗原 1 的亚氨基氢电荷数接近于 0.122, 烯啶虫胺、噻虫胺和呋虫胺亚氨基氢电荷数接近于 0.066)

Fig. 2 Charge distribution of neonicotinoid insecticides and haptens of imidacloprid. The hydrogen charges of the imino groups are close to 0.122 in the imidacloprid and hapten 1, the hydrogen charges of the imino groups are close to 0.066 in the nitenpyram, clothianidin and dinotefuran.

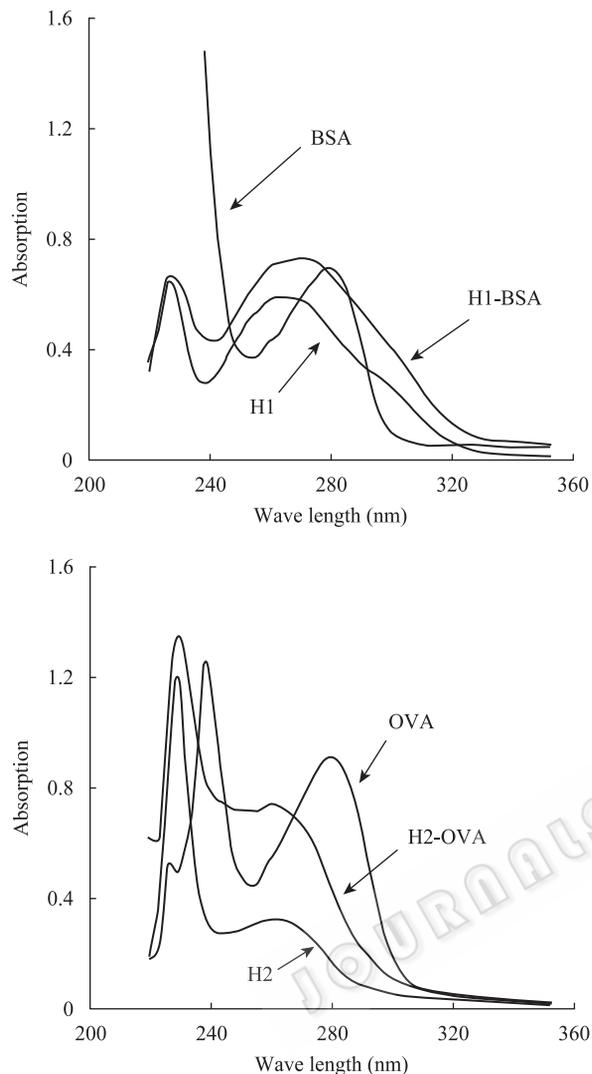


图3 吡虫啉人工抗原紫外扫描谱图

Fig. 3 UV spectrum of the artificial antigens of imidacloprid.

2.5 杂交瘤细胞株的建立及抗体类型鉴定

细胞融合后,经过筛选及细胞单克隆化的过程,共获得2株稳定分泌抗吡虫啉单克隆抗体的杂交瘤细胞株,命名为2F11/A9和2G6/G12。用单克隆抗体类型鉴定试剂盒对杂交瘤细胞株所产生的抗体进行类型鉴定,结果表明杂交瘤细胞株2F11/A9所产生的抗体为IgG3型,2G6/G12所产生的抗体为IgG1型,两株细胞株所产生的抗体轻链均为 κ 链。

2.6 杂交瘤细胞染色体核型分析

正常小鼠脾细胞染色体数目为40条,Sp2/0细胞的染色体数目在60~68条之间,而测得2株杂交

瘤细胞的染色体数目均在100条以上,说明杂交瘤细胞株没有明显的染色体丢失,具有稳定分泌抗体的能力。

2.7 腹水制备和效价测定

腹腔分别注射杂交瘤细胞株2F11/A9和2G6/G12,收集腹水并离心得上清液。两株细胞分泌的腹水抗体的间接ELISA效价均为1:128000。

2.8 抗体检测灵敏度的测定

经四参数logistic函数拟合(图4),2F11/A9分泌的抗体 IC_{50} 为5.3 ng/mL,检测范围为:1.1~38.1 ng/mL,检测限为1.1 ng/mL,曲线的相关系数为0.99982;2G6/G12分泌的抗体 IC_{50} 为28.3 ng/mL,检测范围为:7.7~134.3 ng/mL,检测限为7.7 ng/mL,曲线的相关系数为0.99991。说明本研究制备的抗体可以较好地与吡虫啉分子结合,同时证明了吡虫啉半抗原设计合理,人工抗原合成成功。

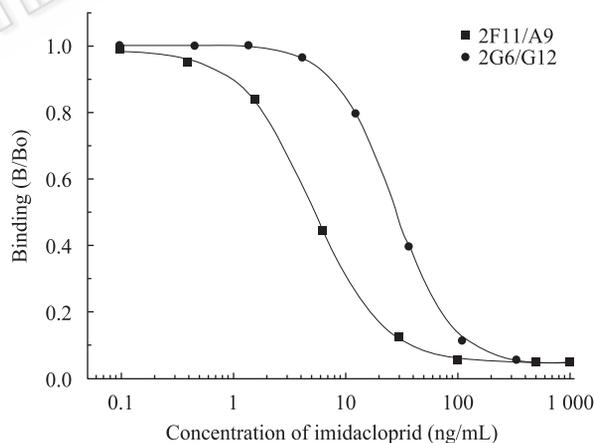


图4 间接竞争ELISA检测吡虫啉的曲线图(B/B₀代表抗体与包被抗原的结合率)

Fig. 4 Binding curve of the indirect competition ELISA. "B/B₀" is binding ratio of antibody/coating antigen.

2.9 交叉反应率

从表1可看出,单克隆抗体2F11/A9与吡虫啉结构类似物的交叉反应率均小于等于1.6%,单克隆抗体2G6/G12也有相同的结果(交叉反应率均小于等于1.4%)。这个结果表明所制备的抗吡虫啉单克隆抗体具有很强的特异性。

表 1 单克隆抗体 2F11/A9 与结构类似物的交叉反应

Table 1 Cross reaction rate of monoclonal antibody (2F11/A9) to analogues

Analogues	Structures	IC ₅₀ (ng/mL)	Cross reaction rate (%)
Imidacloprid		5.3	100.0
Thiacloprid		1 030.0	0.6
Acetamiprid		1 287.0	0.4
Clothianidin		326.7	1.6
Nitenpyram		>2 000.0	<0.3
Dinotefuran		>2 000.0	<0.3
Thiamethoxam		>2 000.0	<0.3

3 讨论

设计出合理的半抗原,合成有效的抗原是获得小分子物质特异性单克隆抗体的前提,吡虫啉属于小分子化合物,本身并不具有免疫原性,因此必须与大分子蛋白偶联后才能成为免疫原,但吡虫啉分子中并没有羧基或氨基等活性基团可用于大分子蛋白的偶联,所以必须对其分子结构加以改造才能用于抗体制备。对于吡虫啉抗体的制备,国内外都取得了一些研究进展, Lee 等^[8]分别从吡虫啉分子的=N-NO₂基团处和咪唑环上亚胺基 H 原子处引入手臂和合成了两种半抗原,并制备了多克隆抗体,前者产生的抗体几乎不能识别吡虫啉,后者产生的抗体 IC₅₀为 17.3 ng/mL,与啶虫脒的交叉反应为 7.1%,与噻虫啉的交叉反应为 1.5%。而 Kim 等^[10]在此基础上进行了改进,选择从吡啶环上的 α-Cl 原子位点入手合成了带-COOH 的半抗原作为免疫半抗原,选择了 Lee 等^[8]的免疫半抗原作为包被半抗原,制备出的单克隆抗体 IC₅₀达 0.8 ng/mL,与啶虫脒的交叉反应仅为 0.6%。在这些以往的研究中,获得的合理半抗原常采用“试错法”^[13],即采用预先设计的几个半抗原免疫动物,通过获得的抗体来评价半抗原的优劣。该方法工作量大、偶然性强。近年来,分子模拟技术的应用使得半抗原设计更加科学化和合理化, Galve 等^[18]利用分子模拟技术对氯苯酚类化合物的半抗原设计进行了研究,并取得了较为理想的实验结果。本研究在前人的基础上进行了总结分析,研究了吡虫啉分子及其结构类似物的电荷分布情况,选择在吡虫啉分子吡啶环上 α-Cl 处引入手臂分子制备的半抗原作为免疫半抗原。结果表明,本研究制备的抗体与吡虫啉结构类似的烟碱类农药均无明显的交叉反应,显示了较强的特异性。对于 Lee 等^[8]制备的抗体与结构类似物有较大交叉反应的问题也可以用本研究中的分子模拟的结果加以解释,从电荷分布上来看,啶虫脒和噻虫啉均含有与吡虫啉分子相似的 α-氯代吡啶环结构,选择此

结构暴露于大分子的表面,无疑会使产生的抗体特异性降低,而本研究中制备的抗吡虫啉单克隆抗体对噻虫胺有较弱的识别,究其原因可能在于噻虫胺分子中的=N-NO₂基团与吡虫啉分子中的极其相似,推测此基团在抗原抗体的识别中具有一定的作用,但由于噻虫胺分子中缺乏咪唑环的结构,使得本研究所制备的抗体与噻虫胺的结合并不强。

在小分子物质免疫分析技术中,通常把与免疫原中的半抗原不同的包被原称为异源包被,由于包被原上组成抗原决定簇的半抗原结构与免疫原上的存在差异,从而使抗体与包被原的结合能力减弱,待测物与抗体结合的能力增强,因此利用异源包被可以有效提高抗体的灵敏度^[19]。谢桂勉等^[19]将制备的抗硫代磷酸二乙酯类农药的抗体在 8 个不同包被原包被的条件下进行 ELISA 检测效果评价,发现在异源包被的情况下,抗体的检测灵敏度普遍大幅提高。本研究利用免疫原和包被原上的半抗原结构的差异性,使所制备的单克隆抗体 (2F11/A9 分泌)的 IC₅₀达到了 5.3 ng/mL,优于先前朱国念等^[11]报道的多克隆抗体 (IC₅₀为 20 ng/mL),但比 Kim 等^[10]报道的单克隆抗体灵敏度低 (IC₅₀为 0.8 ng/mL,检测限为 0.1 ng/mL),究其原因可能在于分泌更灵敏抗体的浆细胞未能与 Sp2/0 进行有效融合。

本研究采用分子模拟技术,成功设计并合成了吡虫啉的人工半抗原,制备了特异性强、灵敏度高的抗吡虫啉单克隆抗体,为吡虫啉残留免疫学检测方法的建立及免疫检测产品的开发奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Qiu G. Advances on the application and hazards of imidacloprid. *Entomol J East China*, 2005, 14(1): 76-81. 邱光. 吡虫啉的应用及其负面效应的研究进展. *华东昆虫学报*, 2005, 14(1): 76-81.
- [2] Chao AH, Xu GJ, Zhu XZ, et al. Determination of imidacloprid residues in tobacco and soil. *Chin Tob Sci*, 2001, 22(4): 45-48. 曹爱华, 徐光军, 朱先志, 等. 烟草及土壤中吡虫啉的

- 残留分析方法研究. 中国烟草科学, 2001, 22(4): 45-48.
- [3] Zhu HX, Chen LM, Chen ZR, et al. Gas chromatography for analysis of imidacloprid in the poisoning serum. *Acta Acad Med CPAF*, 2009, 18(6): 533-535.
朱海霞, 陈礼明, 陈姿如, 等. 气相色谱法用于吡虫啉农药中毒血清分析. 武警医学院学报, 2009, 18(6): 533-535.
- [4] Zhang ZK, Li SN, Zhang R, et al. Studies on residues and degradation dynamics of imidacloprid in *Glycyrrhiza uralensis* and rhizospheric soil in Ningxia. *J Northwest A & F Univ: Nat Sci Ed*, 2010, 38(3): 139-144, 149.
张治科, 李少南, 张蓉, 等. 吡虫啉在宁夏甘草及对应根际土壤中的残留及消解动态研究. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2010, 38(3): 139-144, 149.
- [5] Gao R, Zhao RZ, Xiao H. Determination of pyrimethanil and imidacloprid residue in cucumber by HPLC. *Mod Agrochem*, 2004, 3(6): 21-23.
高蓉, 赵人琤, 肖杭. 高效液相色谱法测定黄瓜中吡虫啉和啮霉胺残留量. 现代农药, 2004, 3(6): 21-23.
- [6] Wu YR, Wang LM, Lou Y, et al. Preparation of organophosphorus pesticide monoclonal antibodies against multiple antigens. *J Nanjing Agric Univ*, 2009, 32(4): 94-99.
吴芸茹, 王利民, 娄咏, 等. 复合免疫制备 3 种有机磷农药单克隆抗体的技术研究. 南京农业大学学报, 2009, 32(4): 94-99.
- [7] Wing KD, Hammock BD, Wustner DA. Development of an S-bioallethrin specific antibody. *J Agr Food Chem*, 1978, 26(6): 1328-1333.
- [8] Lee JK, Ahn KC, Park OS, et al. Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples. *J Agr Food Chem*, 2001, 49(5): 2159-2167.
- [9] Wanatabe S, Ito S, Kamata Y, et al. Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid. *Anal Chim Acta*, 2001, 427(2): 211-219.
- [10] Kim HJ, Shelver WL, Li QX. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid. *Anal Chim Acta*, 2004, 509(1): 111-118.
- [11] Zhu GN, Gui WJ, Zheng ZT, et al. Synthesis and identification of artificial antigen for imidacloprid. *Agri Sci in China*, 2006, 5(4): 307-312.
朱国念, 桂文君, 郑尊涛, 等. 吡虫啉人工抗原的合成与鉴定. 中国农业科学, 2005, 38(3): 511-515.
- [12] Kai L, Qing XL. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid. *J Agri Food Chem*, 2000, 48(8): 3378-3382.
- [13] Liu YH, Zhu GN, Gui WJ. Application of molecular modeling for the hapten design in the immunochemical analysis of pesticide residue and immune recognition mechanism. *Chin J Pestic Sci*, 2007, 9(3): 201-208.
刘毅华, 朱国念, 桂文君. 分子模拟在农药半抗原设计及其免疫识别机制中的应用. 农药学学报, 2007, 9(3): 201-208.
- [14] Yang LG, Hu SC, Wei PH, et al. *Enzyme Immunoassay*. Nanjing: Nanjing University Press, 1998: 255-256, 433-434, 442.
杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998: 255-256, 433-434, 442.
- [15] Zhao L, Wang FL, Yang H, et al. Preparation and characterization of specific monoclonal antibodies against mercury ions. *Chin J Biotech*, 2010, 26(6): 753-759.
赵丽, 王凤龙, 杨慧, 等. 抗重金属汞离子抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2010, 26(6): 753-759.
- [16] Lei HT, Xiao ZL, Fang JS, et al. Preparation of artificial antigen and antibody for butachlor. *Food Sci*, 2007, 28(10): 67-71.
雷洪涛, 肖治理, 方坚生, 等. 丁草胺人工抗原及抗体的制备研究. 食品科学, 2007, 28(10): 67-71.
- [17] Goodrow MH, Harrison RO, Hammock BD. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicide. *J Agr Food Chem*, 1990, 38(4): 990-996.
- [18] Galve G, Camps F, Sanchez-Baeza F, et al. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models. *Anal Chem*, 2000, 72(10): 2237-2246.
- [19] Xie GM, Sun YM, Xu ZL, et al. Design of generic haptens for O, O-Diethyl phosphorothioate pesticides and recognition properties of antibodies. *Chem J Chin Univ*, 2009, 30(11): 2193-2198.
谢桂魁, 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. 高等学校化学学报, 2009, 30(11): 2193-2198.