

徐重新, 刘敏, 张霄, 等. 农药危害风险及其残留检测用广谱特异性抗体研究进展[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 489-496.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.033

农药危害风险及其残留检测用广谱特异性抗体研究进展

徐重新, 刘敏, 张霄, 刘媛, 张存政, 刘贤金

(江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所/省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室/农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 农药残留是威胁农产品质量安全的关键危害因素之一, 是农产品质量安全监管工作的重要对象。当前已被开发和投入使用的农药种类繁多复杂, 农药残留检测工作任务多、责任大, 因此建立一套可用于农药残留检测用的免疫学快速检测方法一直是广大科研工作者努力探索的目标。本文分门别类梳理农产品中主要农药残留及其危害, 探讨国内外抗体创制领域最新热点技术, 并就农药残留检测用广谱特异性抗体研发和应用现状进行概述及展望, 旨在为指导农药残留快速检测技术的研发提供参考。

关键词: 农产品; 农药残留; 广谱特异性抗体; 检测方法

中图分类号: TS207.5⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)02-0489-08

Advances in the development of broad-specificity antibodies for pesticide residue determination

XU Chong-xin, LIU Min, ZHANG Xiao, LIU Yuan, ZHANG Cun-zheng, LIU Xian-jin

(Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base of Ministry of Science and Technology/Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Pesticide residue is one of the key risk factors threatening the quality and safety of agricultural products, and it is also the important object of agricultural products quality safety inspection and supervision work. The types of pesticides that have been developed and used in agricultural production are numerous and complicated, the inspection work has many tasks and heavy responsibilities. Therefore, the establishment of a set of rapid immunoassay methods for pesticide residue detection has been the goal of scientific research workers. In this paper, the main types of pesticide residues in agricultural products and the corresponding hazards for people and animals were reviewed, the latest hotspot technologies in the field of antibody preparation at the domestic and foreign were explored, and the development and application of broad-specificity antibodies for pesticide residue detection were summarized and prospected, in order to provide reference for guiding the research and development of the rapid detection technology used in pesticide residue analysis.

Key words: agricultural products; pesticide residue; broad-specificity antibodies; detection methods

收稿日期: 2018-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701724、31630061、31371778);
江苏省农业科学院自然科学基金项目(6111676)

作者简介: 徐重新(1987-), 男, 湖南新田人, 博士, 助理研究员, 从事食品质量安全规范与控制技术研究。(E-mail) hlxycx@163.com

通讯作者: 刘贤金, (E-mail) jaasliu@jaas.ac.cn

农药作为当今世界农业生产不可或缺的重要生产资料,主要用于防控病虫害、杂草及鼠类等,有效保障了农作物的产量和质量,带来了巨大的社会效益和经济效益^[1]。同时,也因为农药在农业生产过程中的大量使用,其在农产品、水及土壤环境中的残留,给生态环境造成了巨大的负面影响,严重威胁人及动物健康^[2-3]。近年来农药引发的影响较大的农产品质量安全事件也时有发生,如2010年海南“毒豇豆”事件、2013年山东潍坊“毒生姜”事件等,导致多名消费者中毒,影响较大,严重挫伤广大消费者对农产品消费信心^[4]。农产品产供过程的用药安全关系到广大老百姓的日常生活,是关乎国计民生的大事,党中央和国务院各有关职能部门高度重视。习总书记2013年在中央农村工作会议上就提出农产品质量安全是“产出来”与“管出来”的重要论断,要求以“四个最严”确保广大老百姓“舌尖上的安全”;2016年12月原国家卫计委、农业部 and 食药总局联合发布了食品安全国家标准《食品中农药残留最大限量》(GB2763-2016),规定了中国食品中433种农药4140项最大残留限量指标,配套的检测方法接近1000个;与此同时,新修订的《食品安全法》和《农药管理条例》已分别在2015年10月1日和2017年6月1日正式颁布实施,《农产品质量安全法》也在着手修订当中^[5]。农药残留监测作为农产品准入市场前的最后一道工序,是保障农产品质量安全的最后一道防线。当前农药残留检测分析方法主要分为高精度的仪器分析法[气相色谱法(GC)、液相色谱法(HPLC)、气相/液相色谱串联质谱法(GC/HPLC-MS)]和快速检测法(免疫分析法、酶抑制法、生物传感器法、活体检测法和液体工作站检测法等)^[6]。众多方法中,基于“抗原-抗体”结合原理的免疫学检测方法因其具有操作简单、特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大等特点,适用于现场样品分析和大容量样品检测,是农药残留检测的研究热点^[7]。同时,很多类型的农药都具有通用结构或共性区域等特点^[8],这也为农药检测用广谱特异性抗体提供了依据和可能,本文着重就广谱检测用抗体在农药残留检测上的研究及应用状况进行概述。

1 当前农药使用状况及其主要残留风险

农药作为用于防控农林病虫害及杂草和调节农作物生长的药品的统称,其具有来源广、品种多、成分复杂等特点,是当今农业生产中必不可少的投入品,为农业增产保收做出了巨大贡献^[9]。与此同时,随着农业生产对农药的过渡依赖,长期大量使用农药(特别是化学农药)导致农药残留、土壤功能退化、水体和环境污染、生物链结构中断以及生态失衡等一系列问题日益凸显^[2,10]。有证据表明,相当一部分化学农药对人畜具有高“三致”(致癌、致畸、致突变)危害风险,越来越引起科学界和政府部门的高度关注^[11-12]。按来源可将农药划分为无机农药(砷酸类、氯酸类、硫酸铜等有毒有害无机物)、有机合成农药(有机氯类、有机磷类、拟除虫菊酯类、三嗪类和新烟碱类等合成农药)和生物农药(微生物农药、植物和动物等代谢产物或提取物以及转基因生物毒素)等三大类。本文按类别划分,整理了几种较为典型的代表性农药的主要用途、危害风险及其每日允许摄入量等信息(表1)。

无机农药主要是源于天然的无机类化学物质或其制剂,在早期农业生产上发挥了重要作用,然而随着科技的发展,其多数品种因具有毒性强、安全性差、药效欠佳及使用量大等缺点,逐渐被淘汰,其中汞制剂、砷铅类等早已被列入国家禁用农药名录^[13]。有机氯农药[如DDT(Dichlorodiphenyltrichloroethane)、六六六(Hexachlorocyclohexane)、艾氏剂(Aldrin)等]主要以苯、环戊二烯以及松节油为原料,结构稳定,不易降解,具有持久性、远距离迁移性、生物蓄积性等特点,能引起人畜慢性中毒,目前有机氯农药已经在世界范围内开始被陆续禁止生产和使用^[14]。有机磷农药多数属于磷酸酯类或硫代磷酸酯类化合物,其残留引发的中毒特征主要是导致神经系统机能失调,引发身体不良状况,中国农药食物中毒事件中有有机磷农药高居首位,其中甲胺磷(Methamidophos)、对硫磷(Parathion)、毒死蜱(Chlorpyrifos)、甲拌磷(Phorate)等已被列入国家禁用农药名录^[15-16]。拟除虫菊酯(Pyrethroid)是由天然除虫菊素改变结构后发展而来,是一类类似于天然

除虫菊素 (Pyrethrin) 的有机化学合成物 (如高效氯氟氰酯、顺式氯氰菊酯、顺式氰戊菊酯等), 因其对作物和多种害虫具有高选择性、高效率、低毒性、快速杀虫和残留少等优点, 在现代农业生产中占据了较大市场份额, 但菊酯类农药对水生生物具有特异性高毒活性, 因而严重威胁水生生物群落平衡^[17-18]。新烟碱类有机农药也是近年来蓬勃发展的人工合成的超高效杀虫剂 [如啉虫脒 (Acetamiprid)、噻虫胺 (Clothianidin)、吡虫啉 (Imidacloprid)、噻虫啉 (Thiacloprid) 等], 具有广阔的发展前景, 对昆虫具有高杀虫活性, 而对人及哺乳动物低毒, 属于安全农药^[19]。生物农

药是非化学合成的天然生物源化合物, 具有类似农药的作用, 主要来源于生物活体或其代谢产物 [如当前使用较为成熟的有苏云金芽孢杆菌 Bt 毒素 (*Bacillus thuringiensis*, Bt)、2, 4-D (2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid)、沙蚕毒素 (Lumbriconeris heteropoda)、阿维菌素 (Abamectin) 等], 一般认为其具有对人畜和非靶标生物安全、环境兼容性好、不易产生抗性、易于保护生物多样性等优点, 对人类健康、环境保护和农业的可持续发展都有重大的意义^[20], 但近年也不断暴露出一些安全隐患, 引起关注^[21-23]。

表 1 农药主要类别、用途及危害风险
Table 1 The main category, application and hazard risk of pesticides

| 农药类别 | | 典型代表 | 主要用途 | 危害风险 | 每日允许摄入量 [mg/(kg · d) , bw] | |
|--------|----------|---------|---|---|-----------------------------------|--|
| 无机农药 | | 汞制剂 | 用于种子和土壤消毒 | 破坏中枢神经,导致脑和肝损伤,属禁用农药 | 0.043 0 | |
| | | 砷铅类 | 防治果树虫害,也用于除草剂 | 危害消化和呼吸功能,甚至致癌,属禁用农药 | 0.015 0~0.214 0 | |
| | | 磷化铝 | 主要用于熏杀货物的仓储害虫、空间的多种害虫、粮食和种子的储粮害虫以及洞穴啮齿动物等 | 遇水或酸产生磷化氢,引起头晕、头痛、乏力、食欲减退、胸闷及上腹部疼痛等症状,属限用农药 | 0.019 0 | |
| 有机合成农药 | 有机氯农药 | 六六六 | 防治稻螟虫、蚊、蝇、臭虫、蝗虫和小麦吸浆虫等 | 主要在动物中枢神经和脂肪中积累,危害脑组织,扰乱肝脏功能,属禁用农药 | 0.002 0 | |
| | | DDT | 防治农业病虫害,控制蚊子的繁殖以及预防登革热、疟疾、黄热病等 | 被列入致癌物名录,2A 类,属禁用农药 | 0.010 0 | |
| | | 六氯苯 | 抗真菌剂,可防治小麦腥黑穗病和秆黑穗病 | 被列入致癌物名录,2A 类,属禁用农药 | 0.000 3 | |
| | | 三氯杀螨醇 | 广谱性杀螨剂,对成螨、幼若螨和卵均有效果 | 被列入致癌物名录,3 类,属禁用农药 | 0.002 0 | |
| | | 艾氏剂-狄氏剂 | 防控土壤虫害,如根虫、金针虫、水稻象甲虫和蝗虫等 | 被列入致癌物名录,2A 类,属禁用农药 | 0.000 1 | |
| | 拟除虫菊酯类农药 | 溴氰菊酯 | 是菊酯类农药中毒力最高的一种,对鳞翅目、双翅目、鞘翅目和直翅目等有效 | 被列入致癌物名录,3 类 | 0.010 0 | |
| | | 氯氰菊酯 | 对防控蚜虫、斜纹夜蛾、棉铃虫、象鼻虫、尺蠖、卷叶虫、跳甲等效果显著 | 对人中等毒性,对鱼高毒,对蜂蚕有巨毒 | 0.020 0 | |
| | | 甲氰菊酯 | 对鳞翅类害虫高效,主要防治叶螨类、瘿螨类、菜青虫、小菜蛾、甜菜夜蛾、棉铃虫、食心虫和蚜虫等 | 对人中等毒性,属神经毒剂 | 0.030 0 | |
| | | 氯氟氰菊酯 | 对防治棉铃虫、玉米螟、小菜蛾、菜青虫、斜纹夜蛾和马铃薯甲虫等效果明显 | 对人中等毒性,属神经毒剂 | 0.020 0 | |
| | | 联苯菊酯 | 对防治棉铃虫、桃小食心虫、菜蚜、菜青虫、梨小食心虫、山楂叶螨、黄斑蛱和小菜蛾等效果明显 | 对人畜毒性中等,对鱼毒性很高 | 0.010 0 | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

续表 1 Continued 1

| 农药类别 | 典型代表 | 主要用途 | 危害风险 | 每日允许摄入量 [mg/(kg·d), bw] |
|-------|-------|--|---|----------------------------|
| 有机磷农药 | 甲胺磷 | 属广谱高效杀虫剂,对蚜虫、螨类、稻叶蝉和稻飞虱等具有极好防治效果 | 毒性极强,主要抑制胆碱酯酶活性,造成神经生理功能紊乱,属禁用农药 | 0.004 0 |
| | 敌敌畏 | 为广谱性杀虫、杀螨剂,对咀嚼口器和刺吸口器害虫防控效果明显 | 中等毒性,被列入致癌物名录,2B类 | 0.004 0 |
| | 毒死蜱 | 为高效、广谱杀虫剂,尤其对防控褐飞虱效果显著 | 抑制乙酰胆碱酯酶 AChE 或胆碱酯酶 ChE 的活性,从而破坏神经冲动传导,引起中毒,属限用农药 | 0.010 0 |
| | 乐果 | 对蚜虫、叶蝉、粉虱,潜叶性害虫以及某些蚧类防控效果较好 | 中等毒性,引起胃中毒 | 0.002 0 |
| | 甲拌磷 | 对土壤害虫及苗期刺吸式口器害虫以及线虫防控效果显著 | 高毒性,抑制胆碱酯酶活性,造成神经生理功能紊乱,属限用农药 | 0.000 7 |
| 三嗪类农药 | 灭蝇胺 | 属昆虫生长调节剂,能诱使双翅目幼虫和蛹在形态上发生畸变 | 低毒性农药 | 0.060 0 |
| | 阿特拉津 | 属除草剂,用于防控一年生禾本科和阔叶杂草,对稗草、狗尾草和莎草等防控效果明显 | 低毒性农药,被列入致癌物名录,3类 | 0.020 0 |
| 生物农药 | Bt 毒素 | 用于转基因抗虫作物改造,对二化螟、三化螟、大螟和稻纵卷叶螟等常见害虫防控效果显著 | 尚未有充分证据表明有害 | 尚无定量数据 |
| | 2,4-D | 属植物生长调节剂,主要用于防止番茄、棉、菠萝等落花落果及形成无子果实 | 对眼睛、皮肤的刺激作用,反复接触对肝、心脏有损害作用 | 0.010 0 |
| | 阿维菌素 | 属农、兽两用的杀菌、杀虫、杀螨剂,对水稻螟虫、稻纵卷叶螟、小菜蛾、菜青虫、叶螨、瘿螨以及茶黄螨等具有显著防控效果 | 属高毒杀虫剂,对人畜安全,对蜜蜂高毒 | 0.002 0 |

2 抗体的发展及其创制技术

抗体(Antibody, Ab)又称为免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig),是当今生物医药、生命科学基础研究以及免疫学诊断、分析与快速检测等研究领域最热门、使用最广的蛋白质材料^[24-25]。自1890年德国科学家首次证实在免疫动物的血清里有免疫球蛋白存在,随后抗体结构与功能被不断研究、挖掘和利用,并逐渐发展成为一门全新的热门学科—免疫学(Immunology),到目前为止,抗体制备技术已经从第一代的多克隆抗体(Polyclonal antibody, PAb)制备,第二代的单克隆抗体(Monoclonal antibody, MAbs)制备发展到了第三代全新的基因工程抗体(Genetic engineering antibody, GEAb)创制阶段^[26]。多克隆抗体是天然抗原经不同途径免疫动物产生的多种抗体的混合物,其制备过程简单,生产成本低,

无需特殊的仪器设备,而且亲和力普遍较一般的单克隆抗体高,所以目前仍是抗体制备研究领域最为经典和普及的首选方法;然而其存在抗原结合特异性不强、效价低、数量有限、难以重复制备、不利于批量生产等不可避免的缺陷^[27]。目前多克隆抗体主要通过免疫兔、羊、鼠等动物,采集其血清并经纯化(包括饱和硫酸铵盐析、柱亲和层析及吸附法等)获得纯度较高的抗体蛋白^[26]。单克隆抗体是 Kohler 和 Milstein 在 1975 年发现并创制的纯单一性抗体,具有抗原特异性和较高亲和力的特点,由此从根本上解决了传统多克隆抗体存在的抗原特异性和可重复性等问题,是抗体制备技术领域标志性的突破,其在生物医药领域的应用价值尤为凸显,现已获批准上市的单抗类药物有近 50 种,且还有近 300 种已经进入临床试验阶段^[28-29]。目前制备的单克隆抗体以鼠源抗体居多,但单克隆抗体也存在制备周期长、

过程繁琐、专业技术要求高、制备条件苛刻以及杂交瘤细胞传代退化等缺点^[28]。基因工程抗体兴起于20世纪80年代,是伴随分子生物学、分子免疫学等学科飞速发展而来的一项在分子水平对抗体基因进行剪接、修饰及表达与筛选的基因工程人工新型抗体创制技术^[30]。Morrison等^[31]在1984年首次报道人-鼠嵌合体在骨髓瘤细胞中成功表达,并结合Smith等^[32]发明的噬菌体表面展示技术,从而催生了噬菌体表面展示抗体库技术,由此拉开了人工基因工程抗体创制技术的序幕,抗体就此摆脱动物免疫过程并进入能定向进化成熟的新阶段。目前基因工程抗体类型主要有人源化修饰抗体(如人鼠嵌合抗体)、单链抗体(如剑桥大学蛋白质工程中心推出的Tomlinson I+J库)、单域抗体或纳米抗体(如驼源单域抗体,VHH)和随机多肽抗体(如NEB公司推出的七肽库、十二肽库)等,此外还有Fab抗体、二硫键稳定抗体、双特异性抗体等衍生抗体^[33-34]。目前可用于基因工程抗体展示表达的载体主要可以分为噬菌体表面展示系统、核糖体展示系统、酵母展示系统、细菌展示系统、杆状病毒展示系统以及哺乳细胞展示系统等,其中以噬菌体表面展示抗体研究最早、技术最成熟、普及最广、应用最成功,也最为人们所关注^[35-36]。噬菌体抗体是集抗体的表型与基因型于同一个噬菌体上,通过抗原固相筛选,从库中获得抗原特异性抗体的同时也获得其基因,这样极大方便了抗体进一步定向成熟、结构分析以及多宿主转移表达和大量制备等^[37-38]。以噬菌体表面抗体展示技术为代表的新型基因工程抗体创制技术,有效避免了免疫及杂交等繁杂过程,使得抗体制备更方便、更省时、更省力,具备自动化高通量筛选和制备特异性抗体的优势,是当今抗体创制研究领域发展最具潜力的技术。

3 广谱特异性抗体创制策略及其在农药残留检测上的应用

农药虽然来源广、成分复杂、结构多样,但针对其残留检测的免疫学检测方法却大同小异,都是依托制备具有识别多种农药成分的广谱特异性抗体,然后建立免疫学检测方法。依据农药共性结构或化学基团制备针对农药广谱检测用的抗体,是当前农药残留检测免疫分析最主要的方式(表2)。针对小分子农药,大多数都是根据其类别的共性结构或化

学基团来设计、合成与母体结构密切相关的类似物作为通用性半抗原,然后以半抗原为免疫或包被抗原,制备或筛选广谱特异性抗体^[8]。文孟棠等^[39]以拟除虫菊酯通用结构间苯氧基苯甲酸(PBA)为半抗原,免疫制备了具有同时识别4种菊酯类农药的单克隆抗体,检测灵敏度在0.24~1.80 mg/L;Zhao等^[40]以同样的半抗原为包被抗原,从噬菌体抗体库中成功筛选到具有识别多种菊酯农药的单域抗体,检测灵敏度在0.33~0.86 $\mu\text{g/ml}$,并建立检测方法用于实际样品添加回收检测。梁颖等^[41]和贺江等^[42]以甲氧基有机磷类农药通用结构O,O-二甲基硫代磷酸酯(GMP)为半抗原,分别获得了具有同时识别马拉硫磷、稻丰散、乐果、亚胺硫磷等农药的广谱多克隆抗体和人源单链抗体。此外,根据通用半抗原结构,Wang等^[43]制备了二乙氧基有机磷类农药广谱多克隆抗体,Eugenia等^[44]制备了氨基甲酸酯类农药广谱多克隆抗体,王升吉等^[45]制备了2,4-D类农药广谱多克隆抗体,Wang等^[46]制备了阿维菌素类农药广谱单克隆抗体。大分子农药的残留免疫检测用广谱特异性抗体主要依据其三维结构或者氨基酸序列相似的特点免疫制备或靶向库筛选获得^[47]。Dong等^[48-49]和Xu等^[50]通过三维结构分析,发现Bt Cry类生物农药Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1B、Cry1C、Cry1F等毒素蛋白的Domain I区氨基酸和三维结构具有高度同源性和相似性,并以此为依据通过设计分别成功制备或筛选到了具有识别多种Cry毒素的单克隆抗体和单域抗体,建立的免疫学分析方法可用于实际样品添加回收检测。此外针对特异性农药类别的残留检测,也有采用制备决定簇人工抗原^[51]、杂交-杂交瘤抗体^[52]以及基因工程抗体的特性改造^[53-54]等方式的报道。

4 展 望

总的来说,目前广谱特异性抗体在农药残留检测上的应用还处于实验室研究和初步探索阶段,成熟的商品化产品很少,抗体材料和相应的快速检测技术还需进一步加快研究步伐。就抗体材料创制来说,目前传统多克隆抗体、单克隆抗体仍然是农药残留免疫学检测的主流,抗体亲和活力相对稳定、有保障,但从目前发展趋势来看,基因工程抗体在不久的将来必将取代传统多克隆抗体、单克隆抗体用于免疫检测技术研发,不过其前提是基因工程抗体亲和

表 2 广谱特异性抗体在农药残留检测上的应用实例

Table 2 Examples of the broad-specificity antibody for pesticide residue determination

| 农药类别 | 代表种类 | 抗体类型 | 检测灵敏度 | 参考文献 |
|-------------|--|-------|------------------------------|------|
| 拟除虫菊酯类 | 高效氯氰菊酯、氟氰戊菊酯、氯氰菊酯、氰戊菊酯、甲氰菊酯 | 多克隆抗体 | 0.19 $\mu\text{g/ml}$ | [54] |
| | | 单克隆抗体 | 0.241 80 mg/L | [39] |
| | | 单域抗体 | 0.33~0.86 $\mu\text{g/ml}$ | [40] |
| 甲氧基有机磷类 | 马拉硫磷、稻丰散、乐果、亚胺硫磷、扑杀磷 | 多克隆抗体 | 0.076 $\mu\text{g/L}$ | [41] |
| | | 单链抗体 | 10.5 $\mu\text{g/L}$ | [42] |
| 二乙氧基有机磷类 | 对硫磷、治螟磷、三唑磷、毒死蜱 | 多克隆抗体 | 0.005~0.115 $\mu\text{g/ml}$ | [43] |
| | | 单克隆抗体 | / | [55] |
| | | 单链抗体 | 0.2~6.3 ng/ml | [56] |
| | | 十二肽 | 0.358~1.776 $\mu\text{g/ml}$ | [57] |
| 氨基甲酸酯类 | 甲萘威、克百威、涕灭威、西维因、呋喃丹、巴沙 | 多克隆抗体 | 2.0~8.0 ng/ml | [44] |
| 2,4-D 类 | 2,4-D 钠、2,4-D 丁酯、2,4-D 丁酸、2,4-D 异丙酯、2,4-D 二氯苯酚 | 多克隆抗体 | 0.62~1.53 ng/ml | [45] |
| 苯基脲类除草剂 | 异丙隆、敌草隆、伏草隆、利谷隆 | 多克隆抗体 | 0.4~0.8 $\mu\text{g/L}$ | [58] |
| | | 单克隆抗体 | / | [59] |
| 硫代磷酸酯类 | 水胺硫磷、甲基异柳磷、乙基异柳磷 | 单克隆抗体 | 12.19~34.51 ng/ml | [60] |
| 芳氧苯氧丙酸酯类除草剂 | 氰氟草酯、精恶唑禾草灵、恶唑酰草胺 | 多克隆抗体 | 0.002 ~0.004 mg/L | [61] |
| 环戊二烯类有机氯农药 | β -硫丹、狄试剂、艾氏剂、七氯 | 单克隆抗体 | 2.1 ng/ml | [62] |
| 阿维菌素类农药 | 阿维菌素、伊维菌素、埃普里诺菌素 | 多克隆抗体 | 0.10~0.55 ng/ml | [63] |
| | | 单克隆抗体 | 3.97~30.05 ng/ml | [46] |
| | | 单域抗体 | 1.07~15.73 ng/ml | [64] |
| Bt Cry 类农药 | Cry1Ab、Cry1Ac、Cry1B、Cry1C、Cry1F | 单克隆抗体 | 15~30 ng/ml | [48] |
| | | 单链抗体 | 3.14~11.07 ng/ml | [49] |
| | | 单域抗体 | 0.029~0.074 $\mu\text{g/ml}$ | [50] |

活力定向成熟技术要有实质性的突破,目前定点突变 (Site-directed mutagenesis)、易错 PCR (Error PCR)、链置换 (Chain shuffling)、DNA 改组 (DNA shuffling) 等可用于抗体亲和力改造的技术多数处于理论阶段^[65]。就免疫学检测方法来说,目前最为常见的是 ELISA 法,其基于 HRP 显色从而间接反映检测物的存在与否,一般对检测物的可分辨灵敏性不高,这样极大限制了抗体的广谱识别能力;为提高既有抗体的检测灵敏度从而扩大抗体对农药的广谱识别能力,可以大力发展时间分辨荧光免疫分析技术(如抗体标记非放射性稀土离子),如此达到进一步提高抗体对农药的检测灵敏度(可达1 000倍以上)的目的^[66]。

参考文献:

[1] 周本新. 农药功过谁人曾与评说[J]. 农药市场信息, 2016(22): 6-8.

- [2] GRUNG M, LIN Y, ZHANG H, et al. Pesticide levels and environmental risk in aquatic environments in China-a review[J]. Environment International, 2015, 81: 87-97.
- [3] 王运儒, 邓有展, 陈永森, 等. 广西荔枝农药残留现状及膳食风险评估[J]. 南方农业学报, 2018, 49(9): 1804-1810.
- [4] 李培武, 张 奇, 丁小霞, 等. 食用植物性农产品质量安全研究进展[J]. 中国农业科学, 2014, 47(18): 3618-3632.
- [5] 中华人民共和国农业部. 农业部办公厅关于征集《农产品质量安全法》修改意见的函 (EB/OL). (2014-11-24) [2014-11-28]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/ncpzlaq/201411/t20141128_4256470.htm.
- [6] GRIMALT S, DEHOUC P. Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1433: 1-23.
- [7] WATANABE E, MIYAKE S, YOGO Y. Review of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for analyses of neonicotinoid insecticides in agro-environments [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61: 12459-12472.

- [8] 刘 媛,余向阳,梁 颖,等.农药广谱特异性抗体制备技术研究进展[J].江苏农业学报,2009,25(2):428-432.
- [9] 周喜应.略论农药与农业可持续发展[J].中国植保导刊,2014,34(6):67-70.
- [10] YADAVA I C, DEVIN L, SYED J H, et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review of India[J]. Science of the Total Environment, 2015, 511: 123-137.
- [11] 李 敏,傅桂平,吕 宁,等.高危害农药释义及对我国农药管理的启示[J].农药科学与管理,2016,37(6):4-10.
- [12] 郭 晨.高危害农药:健康和环境的杀手[J].生态经济,2016,32(7):6-9.
- [13] BERENBAUM M R. Does the Honey Bee 'Risk Cup' runneth over? Estimating aggregate exposures for assessing pesticide risks to Honey Bees in agroecosystems[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64: 13-20.
- [14] 周培学.近30年有机氯农药和重金属在中国北方啮齿类动物中的变化趋势[D].杭州:浙江工业大学,2015.
- [15] SONG A E, OKONKWO J O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: a review[J]. Talanta, 2016, 155: 289-304.
- [16] ZHANG W, ASIRI A M, LIU D, et al. Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014, 54: 1-10.
- [17] TU W, XU C, LU B, et al. Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos[J]. Science of the Total Environment, 2016, 542: 876-885.
- [18] 杜 洁,张 怡,洪盼盼,等.拟除虫菊酯对斑马鱼氧化代谢相关基因表达影响[J].浙江工业大学学报,2016,44(3):334-339.
- [19] CIMINO A M, BOYLES A L, THAYER K A, et al. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review[J]. Environmental Health Perspectives, 2017, 125(2): 155-162.
- [20] 邱德文.生物农药的发展现状与趋势分析[J].中国生物防治学报,2015,31(5):679-684.
- [21] JIN L, ZHANG H N, LU Y H, et al. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33: 169-174.
- [22] FANG M, ROBERT J K, PETER P M, et al. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 4132-4136.
- [23] BERNSTEIN I L, BERNSTEIN J A, MILLER M, et al. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides[J]. Environmental Health Perspectives, 1999, 107(7): 575-582.
- [24] 许卓斌,王 旻.抗体与抗体药物的前世今生[J].自然杂志,2016,38(4):271-277.
- [25] ZENG N, LI Y, DU M. Recent advances on modeling the lateral flow immunoassay[J]. Journal of Advances in Biomedical Engineering and Technology, 2015, 2: 46-50.
- [26] 王廷华,李官成.抗体理论与技术[M].3版.北京:科学出版社,2013.
- [27] 贾慧娜,罗海玲.多克隆抗体制备方法的研究进展[J].中国草食动物科学,2012,S1:66-69.
- [28] LIU J K H. The history of monoclonal antibody development-Progress, remaining challenges and future innovations[J]. Annals of Medicine and Surgery, 2014, 3(4): 113-116.
- [29] WEINER G J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics[J].Nature Reviews Cancer, 2015, 15: 361-370.
- [30] SANG J K, YOUNGWOON P, HYU J H. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies[J]. Molecules and Cells, 2005, 20(1): 17-29.
- [31] MORRISON S L, JOHNSON M J, HERZENBERG L A, et al. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains[J].Proc Natl Acad Sci USA,1984, 81(21): 6851-6855.
- [32] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. Science, 1985, 228: 1315-1317.
- [33] 锡建中,高宝龙,王建平.广义新型抗体的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2014(23):54-56.
- [34] HOOGENBOOM H R. Selecting and screening recombinant antibody libraries[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(9): 1105-1116.
- [35] 何 扩,张秀媛,杜欣军,等.基因工程抗体在食品安全检测中应用进展研究[J].中国粮油学报,2014,29(8):124-128.
- [36] MERSICH C, JUNGBAUER A. Generation of bioactive peptides by biological libraries[J]. Journal of Chromatography B, 2008, 861(2): 160-170.
- [37] QI H, LU H Q, QIU H J, et al. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction[J]. Journal of Molecular Biology, 2012, 417(3): 129-143.
- [38] LEDAGAARD L, KILSTRUP M, KARATT-VELLATT A, et al. Basics of antibody phage display technology[J]. Toxins, 2018, 10: 236-251.
- [39] 文孟棠,刘 媛,闫 帅,等.抗拟除虫菊酯类农药广谱性单克隆抗体的研制及鉴定[J].分析化学,2014,42(9):1245-1251.
- [40] ZHAO Y Y, LIANG Y, LIU Y, et al. Isolation of broad-specificity domain antibody from phage library for development of pyrethroid immunoassay[J].Analytical Biochemistry, 2016, 502: 1-7.
- [41] 梁 颖,刘 媛,祝金凤,等.甲氧基有机磷杀虫剂广谱特异性抗体的制备[J].分析化学,2008,36(5):647-652.
- [42] 贺 江,梁 颖,樊明涛,等.噬菌体展示技术制备甲氧基有机磷农药抗独特型抗体[J].分析化学,2011,39(2):178-182.
- [43] WANG S T, GUI W J, GUO Y R, et al. Preparation of a multi-

- haptent antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 587: 287-292.
- [44] EUGENIA K, HOSSNY H. Enzyme inhibition and enzyme-linked immunosorbent assay methods for carbamate pesticide residue analysis in fresh produce [J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 63 (12): 1758-1760.
- [45] 王升吉, 尚佑芬, 赵玖华, 等. 2, 4-D 人工抗原合成及 2, 4-D 类农药特异性多克隆抗体的研制 [J]. *农业环境科学学报*, 2008, 27(5): 2052-2057.
- [46] WANG C, WANG Z, JIANG W, et al. A monoclonal antibody-based ELISA for multiresidue determination of avermectins in milk [J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7401-7414.
- [47] 焦凌霄, 徐茜茜, 刘媛, 等. 基于同源建模与分子对接技术构建抗 Bt Cry1 类毒素单链抗体定点饱和突变库 [J]. *现代食品科技*, 2016, 32(3): 12-17.
- [48] DONG S, ZHANG C Z, ZHANG X, et al. Production and characterization of monoclonal antibody broadly recognizing Cry1 toxins by use of designed polypeptide as haptent [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88: 7023-7032.
- [49] DONG S, BO Z Y, ZHANG C Z, et al. Screening for single-chain variable fragment antibodies against multiple Cry1 toxins from an immunized mouse phage display antibody library [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102: 3363-3374.
- [50] XU C X, ZHANG X, Liu X Q, et al. Selection and application of broad-specificity human domain antibody for simultaneous detection of Bt Cry toxins [J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 512: 70-77.
- [51] 王姝婷. 农药多簇人工抗原的免疫特异性及多残留免疫金技术 [D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [52] JIN R Y, GUO Y R, WANG C M, et al. Development of a bispecific monoclonal antibody to pesticide carbofuran and triazophos using hybrid hybridomas [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74 (1): 1-6.
- [53] 李永芳, 雷红涛. 食品中小分子有害物多组分广谱免疫分析研究进展 [C]//广东省食品学会. “健康与安全”学术研讨会暨 2015 年广东省食品学会年会论文集. 广州: 中国学术期刊电子出版社, 2015: 133-142.
- [54] 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.
- [55] LIU Y, LOU Y, XU D, et al. Production and characterization of monoclonal antibody for class-specific determination of *O, O*-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of heterologous coating antigens on immunoassay sensitivity [J]. *Microchemical Journal*, 2009, 93: 36-42.
- [56] 周丽君, 黄启欣, 雷红涛, 等. 二乙氧基硫代磷酸酯类有机磷农药单链抗体的制备及广谱特异性 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(10): 2269-2274.
- [57] 赵扬. 通用有机磷农药抗原表位多肽、单域抗体的制备及应用 [D]. 新乡: 河南科技学院, 2016.
- [58] SCHNEIDER P, GOODROW M H, GEE S J, et al. A highly sensitive and rapid ELISA for the arylurea herbicides diuron, monuron, and linuron [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(2): 413-422.
- [59] KARU A E, GOODROW M H, SCHMIDT D J, et al. Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(2): 301-309.
- [60] 秦娜. *O*-(2-异丙氧基羰基苯基) 硫代磷酸酯类农药多残留免疫分析技术研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [61] 任克维. 芳氧苯氧丙酸酯类除草剂多残留酶联免疫分析方法研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [62] 肖陈贵, 顾大勇, 丁晶, 等. 环戊二烯类有机氯农药单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(11): 3425-3430.
- [63] 于姣. 食品中阿维菌素类药物酶联免疫检测方法的研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2010.
- [64] CHEN M, DING S Y, WEN K, et al. Development of a fluorescence-linked immunosorbent assay for detection of avermectins using a fluorescent single-domain antibody [J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(9): 3728-3734.
- [65] 刘媛, 林曼曼, 张霄, 等. 基因突变技术在抗体亲和力和体外成熟中的应用 [J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2016, 42(1): 1-7.
- [66] 张兆威, 李培武, 张奇, 等. 农产品中黄曲霉毒素的时间分辨荧光免疫层析快速检测技术研究 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47 (18): 3668-3674.

(责任编辑: 陈海霞)