

赵 扬, 武爱华, 张 霄, 等. 有机磷农药广谱抗原表位多肽的制备及应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 444-449.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.032

## 有机磷农药广谱抗原表位多肽的制备及应用

赵 扬<sup>1,2</sup>, 武爱华<sup>2</sup>, 张 霄<sup>2</sup>, 莫海珍<sup>1</sup>, 张存政<sup>2</sup>, 刘贤金<sup>2</sup>, 胡梁斌<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院食品学院, 河南 新乡 453000; 2. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 利用噬菌体展示技术, 以广谱型单克隆抗体筛选十二肽噬菌体展示库, 获得能够模拟有机磷类农药抗原表位的十二肽, 建立了一种间接竞争 ELISA 方法用于检测多种有机磷类农药。结果表明, 获得的特异性多肽氨基酸序列为 HPAPDHSSQSHQ, 呈现出较好的抗原性、亲水性及表面可及性, 可广谱模拟有机磷农药抗原表位。所建立的间接 ELISA 方法对有机磷农药通用结构半抗原(BPB)的  $IC_{50}$  和  $IC_{10}$  分别为 1.776  $\mu\text{g/ml}$  及 0.358  $\mu\text{g/ml}$ , 与对硫磷、蝇毒磷、乙拌磷、辛硫磷、啶硫磷和三唑磷的交叉反应率分别为 58.74%、44.93%、52.03%、43.98%、36.82% 和 4.87%。建立的检测方法具有绿色、广谱、高效的特点, 是一种新型有机磷类农药累积毒性检测技术。

**关键词:** 有机磷类农药; 噬菌体展示十二肽库; 模拟抗原表位多肽; 间接竞争 ELISA

**中图分类号:** X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0444-06

## Preparation and application of broad spectrum antigen epitope peptide against organophosphorus pesticides

ZHAO Yang<sup>1,2</sup>, WU Ai-hua<sup>2</sup>, ZHANG Xiao<sup>2</sup>, MO Hai-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Cun-zheng<sup>2</sup>, LIU Xian-jin<sup>2</sup>, HU Liang-bin<sup>1</sup>

(1. School of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453000, China; 2. Institute of Food Quality Safety and Detection Research, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Using phage display technology, polypeptides mimicking organophosphorus pesticides antigen epitope were obtained by broad anti-organophosphates monoclonal antibody screening. Thereby, an indirect competitive ELISA method for the multi-determination of BPB and organophosphates pesticides was established using polypeptide as immobilized antigen. The obtained sequence of polypeptide is HPAPDHSSQSHQ, featured by good antigenicity, hydrophilicity and surface accessibility. The  $IC_{50}$  and  $IC_{10}$  for the hapten BPB detected by the indirect ELISA were 1.776  $\mu\text{g/ml}$  and 0.358  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The cross-reactivities with parathion, coumaphos, disulfoton, phoxim, quinalphos and triazophos were 58.74%, 44.93%, 52.03%, 43.98%, 36.82% and 4.87%. As a green, high-throughput technology, the broad specific immunoassay provide a new technical route for the accumulative toxicity determination of organophosphorus pesticides.

**Key words:** organophosphates pesticide; phage displayed random 12-mer peptide library; antigen epitope mimicking peptide; indirect competitive ELISA

收稿日期: 2016-05-30

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20131333); 江苏省科技支撑计划项目(BE2014722)

作者简介: 赵 扬(1989-), 男, 河南安阳人, 硕士, 主要从事农产品质量与安全研究。(E-mail) 13913979573@163.com

通讯作者: 胡梁斌, (E-mail) hulb973@163.com

有机磷类农药具有神经毒性, 可以使乙酰胆碱酯酶磷酸化而失活, 影响神经效应器、自主神经以及神经与肌肉节点, 从而引起麻痹和肌无力<sup>[1]</sup>。有机磷类农药可以通过消化道、皮肤甚至呼吸系统进入人体<sup>[2]</sup>。农业部第199号公告中列出的禁止在农产品中使用的农药共有19种, 其中有机磷类农药占

17 种。

有机磷农药的检测有一系列基于液相气相色谱的分析方法<sup>[3-4]</sup>和酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[5-7]</sup>。ELISA 法具有高通量、高灵敏度和特异性强的特点。基于单克隆和多克隆抗体建立的 ELISA 检测方法操作难度大且时间长<sup>[8]</sup>。利用噬菌体展示技术,可筛选到特异结合靶分子的多肽,为快速、高效检测方法的建立提供了可能<sup>[9]</sup>。用噬菌体展示技术可将多肽或者蛋白质表达在噬菌体的表面<sup>[10]</sup>,而且在高温<sup>[11]</sup>、酶催化<sup>[12]</sup>和有机溶剂中<sup>[13]</sup>都具有良好的稳定性。

目前,应用噬菌体展示技术,针对农药小分子制备表位多肽、抗体及抗独特型抗体,建立无毒无害、绿色检测方法的研究发展较快<sup>[14-15]</sup>。但基于有机磷农药抗独特型抗体的绿色检测方法的研究相对较少,特别是对具有相同毒性机理、严重影响人类健康的家族类农药,急需绿色的快速检测方法。

本研究利用噬菌体展示技术,筛选能模拟有机磷类农药通用结构(BPB)抗原表位的多肽,建立针对有机磷类农药的绿色 ELISA 检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

BPB-KLH 小鼠单克隆抗体,由本实验室(江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所分子技术与生物安全研究室)制备并鉴定活性;HRP 标记的抗 M13 抗体,购于 Pharmacia 公司;Ph.D.-12 噬菌体展示肽库试剂盒、宿主菌 *Escherichia coli* ER2738 以及 gⅢ测序引物(5'-<sup>H</sup>CCCTCATAGTTACG-3'),购于英国 NEB 公司;牛血清白蛋白(BSA)购于 Sigma 公司;四环素、异丙基硫代半乳糖苷、5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷(x-gal),购于北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 抗体制备纯化及鉴定

复苏并培养单克隆细胞,制备腹水,用辛酸-硫酸铵法<sup>[16]</sup>初步纯化抗体,用 protein G 纯化柱进一步纯化初纯抗体,SDS-PAGE(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)电泳测定抗体纯度,ELISA 检测抗体灵敏度与活性。

### 1.3 十二肽库筛选有机磷农药抗独特型抗体

将有机磷农药单克隆抗体(Anti-BPB)用 0.1

mol/L NaHCO<sub>3</sub>(pH8.6)稀释到 100 μg/ml,将 1.5 ml 抗体稀释液均匀包被于无菌酶联免疫六孔板一孔中,在 4 ℃ 环境中温和摇动过夜(20 r/min)。第 2 d 弃去包被液,在吸水纸上用力拍干,TBST(50 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% tween-20)洗涤 3 次后,用 3.0 ml 封闭液(0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 5 mg/ml BSA),37 ℃ 下封闭 2 h。重复弃液过程,TBST 快速清洗 6 次,注意动作迅速,防止板底干燥。取 10 μl 十二肽库(2×10<sup>9</sup>个克隆),溶解到 1 ml TBST 中,加入孔中,室温温和摇动 60 min。弃去噬菌体溶液,用 TBST 洗涤 10 次,在吸水纸上拍干。加入 500 μl 浓度为 1 mmol/L BPB 进行竞争洗脱,室温温和摇动 1.0 h,收集竞争洗脱液。每轮噬菌体筛选的产出和投入都进行滴度测定。

在接下来 3 轮筛选过程中,维持抗体包被量。从第 2 轮开始,洗涤次数增加到 30 次,Tween-20 浓度增加到 0.5%,并且加入扣除淘选步骤:先将扩增好的噬菌体加入到 100 μg/ml BSA 包被过夜孔中,室温温和摇动 1.0 h 后再将其转移到包被抗体的孔中,室温温和摇动 1.0 h。进行竞争洗脱。

噬菌体滴度测定:在 LB 培养基中将噬菌体 1:100 接种于宿主菌 *E. coli* ER2738,培养至对数中期 3.0 h(*OD*<sub>600</sub>≈0.5)。将顶层培养基加热并且分装 3.0 ml,放在 45 ℃ 水浴中保温。将制备好的 LB/IPTG/Xgal 平板放置于 37 ℃ 培养箱中预热。每个稀释梯度的噬菌体分别取 10 μl,加入到 200 μl ER2738 中,振荡混匀,室温下反应 5 min。菌液侵染完毕后加入到温育的顶层培养基中,迅速混匀,倒入平板。倾斜旋转平板,冷却 5 min 后倒置于 37 ℃ 培养箱中培养过夜。第 2 d,选择小于 100 个噬菌斑的平板进行滴度计算。

噬菌体扩增:将洗脱的噬菌体加入到 20.0 ml 对数前期的 ER2738 中,37 ℃ 中剧烈摇晃培养 4.5 h(250.0 ml 三角瓶)。扩增完毕后转移至 50.0 ml 离心管中,4 ℃、12 000 g 离心 10 min,上清转移到新离心管中,再次 4 ℃、12 000 g 离心 2 min。上清加入 3.4 ml PEG/NaCl 溶液(20% PEG8000, 2.5 mol/L NaCl),4 ℃ 沉淀过夜。次日 4 ℃ 12 000 g 离心 15 min。弃上清,再离心。沉淀重悬于 1.0 ml TBS[50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 150 mmol/L NaCl]中,14 000 g 离心 5 min,去除细胞碎片,再次重悬于 1.0 ml TBS 中,即为噬菌体扩增液。

#### 1.4 噬菌体阳性克隆的鉴定

将  $1\text{ }\mu\text{g/ml}$  有机磷单抗加入 96 孔酶标板中, 每孔  $100\text{ }\mu\text{l}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  包被过夜。甩去包被液, 用 TBST 洗板 3 次, 拍干后加入 3% 脱脂奶粉封闭, 每孔  $200\text{ }\mu\text{l}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置  $2.0\text{ h}$ 。弃去封闭液, 用 TBST 洗涤 3 次后加入 10 倍稀释后的噬菌体溶液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下反应  $1.5\text{ h}$ 。用 3% 脱脂奶粉  $1:5\text{ }000$  稀释 HRP 标记的抗 M13 抗体,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $1.0\text{ h}$ 。用 TBST 洗板 4 次, 加入显色液,  $15\text{ min}$  后用  $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$  终止显色反应, 用酶标仪测定  $OD_{450}$ , 重复 3 次。不加噬菌体溶液孔设定为阴性对照组, 试验组/阴性对照组比值大于 2.1, 即可判定为阳性孔。

#### 1.5 噬菌体 DNA 测定

扩增阳性噬菌体克隆, 测序引物为  $5'\text{-}^{\text{H}0}\text{CCCT-CATAGTTACG-3'}$ 。菌液送金斯瑞公司测序。

#### 1.6 有机磷农药竞争抑制试验

方阵滴定法确定最佳工作浓度, 将浓度为  $0.06\text{ }\mu\text{g/ml}$  的鼠单克隆抗体加入 96 孔板中, 每孔  $100\text{ }\mu\text{l}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  包被过夜。次日 PBST 洗涤 3 次, 加入 3% 脱脂奶粉, 每孔  $200\text{ }\mu\text{l}$ , 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下封闭  $2.0\text{ h}$ 。在这期间, 将  $50\text{ }\mu\text{l}$  噬菌体 ( $1\times 10^9\text{ CFU/ml}$ ) 分别与  $50\text{ }\mu\text{l}$  浓度为  $20.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $5.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $2.500\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $1.250\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.625\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.313\text{ }\mu\text{g/ml}$  和  $0.156\text{ }\mu\text{g/ml}$  的 BPB 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下预混  $1.0\text{ h}$ 。封闭完成后, PBST 洗板 3 次, 将预混液加入孔中。阳性对照为  $50\text{ }\mu\text{l}$  噬菌体和  $50\text{ }\mu\text{l}$  PBS, 阴性对照为  $100\text{ }\mu\text{l}$  PBS,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $1.5\text{ h}$ 。PBST 洗板 3 次, 加入用封闭液 5 000 倍稀释的抗 M13 抗体, 每孔  $100\text{ }\mu\text{l}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应  $1.0\text{ h}$ 。PBST 洗板 4 次, 加入显色液,  $15\text{ min}$  后每孔加入  $50\text{ }\mu\text{l}$   $2\text{ mol/L H}_2\text{SO}_4$  终止反应。用酶标仪测定  $OD_{450}$ , 计算抑制率<sup>[17]</sup>。

#### 1.7 噬菌体克隆交叉反应率的测定

利用间接竞争 ELISA 方法测定阳性噬菌体克隆对不同有机磷农药的敏感性。包被有机磷农药单抗 ( $0.6\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), 每孔  $100\text{ }\mu\text{l}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜。次日封闭完成后, 将硫磷、蝇毒磷、乙拌磷、辛硫磷、啶硫磷、三唑磷分别用 10% 丙酮/PBS 稀释 6 个浓度梯度:  $20.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $5.000\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $2.500\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $1.250\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.625\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。取  $50\text{ }\mu\text{l}$  农药与  $50\text{ }\mu\text{l}$  噬菌体 ( $1\times 10^9\text{ CFU/ml}$ ) 于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下预混  $1.5\text{ h}$ 。PBST 洗板 3 次后, 加入预混液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  预混  $1.5\text{ h}$ 。经过添加抗 M13 抗体, 显色, 测定  $OD_{450}$ 。设置

阳性对照组, 计算抑制率。阻断剂分别为硫磷、蝇毒磷、乙拌磷、辛硫磷、啶硫磷、三唑磷, 计算上述农药  $IC_{50}$  和交叉反应率 (CR),  $CR = IC_{50, \text{BPB}}/IC_{50, \text{农药}} \times 100\%$ <sup>[17]</sup>。

#### 1.8 噬菌体十二肽模拟表位的同源性及理化性质鉴定

将目的片段翻译成十二肽氨基酸序列, 登陆 NCBI 网站, 利用 Protein Blast 进行蛋白质的同源性分析。利用 ProtParam 软件初步分析预测目的片段的理化性质。

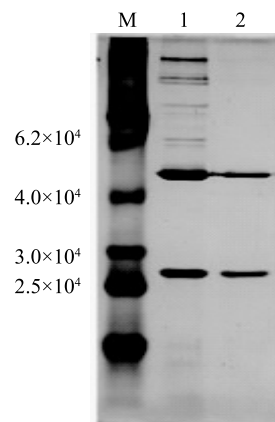
#### 1.9 噬菌体十二肽模拟抗原表位及其预测

利用 Lasergene Protean 程序预测噬菌体十二肽的抗原表位。

## 2 结果

#### 2.1 抗体制备纯化及鉴定

复苏培养细胞制备腹水, 利用辛酸-硫酸铵法初步纯化腹水后, 用 Protein G 柱纯化抗体。ELISA 法检测抗体效价, 用 SDS-PAGE 检测抗体纯度。结果 (图 1) 显示, 在  $5.5\times 10^4$  (重链) 和  $2.5\times 10^4$  (轻链) 处有清晰的条带。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 初步纯化的单抗; 2: 过柱纯化的单抗。

图 1 BPB-KLH 小鼠单克隆抗体的纯化

Fig.1 Purification of the monoclonal antibodies for BPB-KLH in mice

#### 2.2 利用十二肽库淘选有机磷类抗独特型抗体

对每一轮投入产出比的分析结果表明, 投入量稳定, 特异性结合靶分子的噬菌体得到充分富集 (表 1)。

表 1 噬菌体展示十二肽库针对 BPB 单抗筛选的投入产出比

Table 1 Recovery of affinity selection of polypeptide against BPB from phage displayed random 12-mer peptide library

筛选轮数	噬菌体投入量 (pfu)	噬菌体产出量 (pfu)	产出/投入
1	$4.0 \times 10^{10}$	$2.2 \times 10^4$	$5.5 \times 10^{-7}$
2	$1.0 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^5$	$1.7 \times 10^{-6}$
3	$1.6 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^6$	$1.9 \times 10^{-5}$
4	$1.1 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^6$	$6.4 \times 10^{-5}$

## 2.3 ELISA 鉴定阳性克隆

从第 4 轮筛选结果中挑选 20 个噬菌体单克隆并编号,进行单克隆 ELISA 验证,共鉴定出 5 个阳性克隆(阳性值/阴性比值 $>2.1$ ),分别为 4 号、5 号、7 号、10 号和 18 号(图 2)。

## 2.4 噬菌体十二肽测序结果

将得到的 5 个阳性克隆进行测序,得到 3 种不同的氨基酸序列(表 2)。

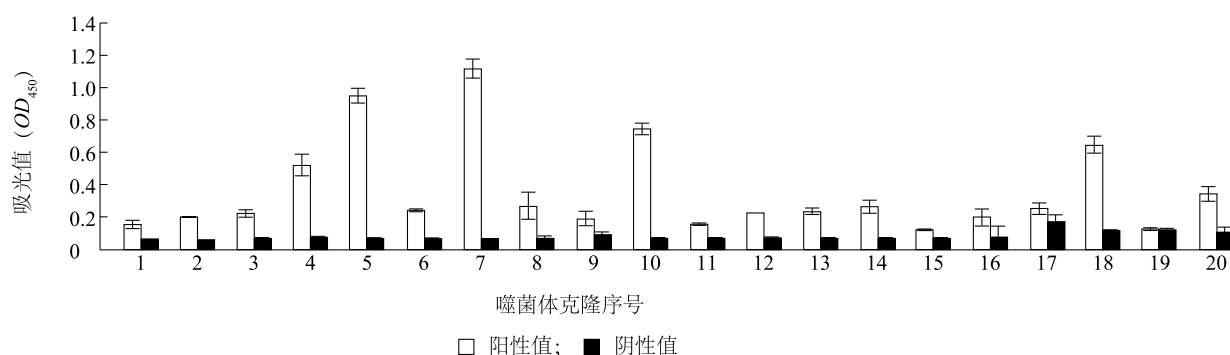


图 2 噬菌体阳性克隆 ELISA 测定

Fig.2 The positive phage clones selected by ELISA

表 2 5 个噬菌体阳性克隆的测序结果

Table 2 The sequences of the five positive clones of phage

编号	碱基序列(5'→3')	氨基酸序列
4、7	GGAAGGCACCGACCCCAAAGGCCTCGACATCGTAGC	KAPTPKASTS-Q
5	ACCCCGCCCCAGATCATCTTCGCGAGTCTCATCAA	HPAPDHSSQSHQ
10、18	CTGCACACTCGTCACACGCCCCACATCATTATCATA	PAHSSHAPHHYH

## 2.5 噬菌体阳性克隆竞争抑制曲线

将噬菌体上清与 BPB 进行预混,然后结合固相化的 BPB 抗体。结果表明,5 号噬菌体(HPAPDHSSQSHQ)竞争效果明显,在最佳工作浓度下,随着 BPB 浓度的不断增大,对噬菌体与有机磷农药抗体结合的影响也不断增大(图 3)。4 号、10 号噬菌体无竞争活性。5 号噬菌体抗体对 BPB 的抑制率关系为  $Y = 57.464x + 35.667$ , 线性范围为  $0.625 \sim 10.000 \mu\text{g/ml}$ , 相关系数  $r = 0.9982$ ,  $IC_{50}$  为  $1.776 \mu\text{g/ml}$ ,  $IC_{10}$  为  $0.358 \mu\text{g/ml}$ 。

## 2.6 噬菌体与不同农药的交叉反应率

由于 BPB 是有机磷类农药的通用结构,所以此模拟抗原表位多肽能够与多种有机磷农药竞争结合

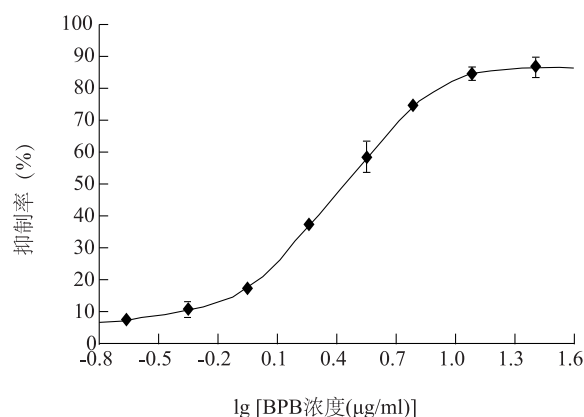


图 3 阳性克隆间接竞争 ELISA 结果

Fig.3 The resultsof indirect competitive ELISA amongpositive clones



抗体(表 3)。

表 3 噬菌体与不同农药的交叉反应率

Table 3 The cross-reactions of the phage against different pesticides

农药名称	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	交叉反应率 (%)
BPB	1.776	100.00
对硫磷	3.023	58.74
蝇毒磷	3.953	44.93
乙拌磷	3.413	52.03
辛硫磷	4.038	43.98
啶硫磷	4.823	36.82
三唑磷	36.468	4.87

## 2.7 噬菌体十二肽模拟表位的同源性及其理化性质

将目的片段碱基序列翻译为氨基酸序列,登陆 NCBI 网站,利用 Protein Blast 进行蛋白质同源性分析,发现数据库中有一种蛋白质(编号为 WP\_056927953.1,是诺卡氏菌 Soil805 冷凝固蛋白 B)在 218~222 位置与筛选到的噬菌体十二肽序列 PAP-DH 完全一致,同源性为 82%。利用 ProtParam 软件分析序列 HPAPDHSSQSHQ,其分子量为 1 327.3,  $pI$  值是 6.25,在酵母菌中的半衰期为 10 min,在大肠杆菌中的半衰期大于 10.0 h,不稳定指数为 101.3 (大于 40.0 为不稳定),平均亲水性指数为 -1.992 (小于 0 为亲水)。

## 2.8 噬菌体十二肽模拟抗原表位预测

利用 Lasergene Protean 软件分析序列 HPAP-DHSSQSHQ 的抗原表位。按照 Plot-Emini 方法分析预测蛋白质表面可及性,按照 Plot-Kyte-Doolittle 氨基酸亲水性分析方法分析多肽的亲水区,按照 Garnier-Robson 方法分析预测多肽二级结构,按照 Jameson-Wolf 方法分析预测多肽中抗原指数较高的区域。结果显示,位于 N 端第 3~10 个氨基酸区域的抗原指数最高,此区域氨基酸形成的是  $\beta$  转角,其表面可及指数和氨基酸亲水性指数均大于 0,推测多肽的抗原表位极有可能在此区间。

## 3 讨论

本试验利用快速高效的噬菌体展示十二肽库筛选技术,成功筛选出能够模拟 BPB 抗原表位的多

肽,并利用间接竞争 ELISA 方法,建立了一种针对有机磷类农药的高效、广谱、无毒检测新方法。

在噬菌体筛选过程中,随着每轮的淘选与扩增,与靶分子特异性结合的噬菌体得到充分扩增。每轮都保持稳定的投入量,直到大多数噬菌体都有一个共同的序列为止。根据不同的筛选策略和筛选交互作用,淘选需要 2~3 轮,如果 3 轮后仍没有共有序列,可以再次扩增进行第 4 轮筛选,也有进行 5 轮甚至更多轮数筛选的报道<sup>[18]</sup>。交叉使用不同淘选策略也有报道<sup>[19]</sup>。试验中会出现扩增效果差的现象,其原因可能是没有通气培养或在宿主菌未达到对数前期时接种噬菌体而导致。正确的方法是在对数前期接种 ( $OD_{600} < 0.05$ ),过长时间培养会导致噬菌体某些特性丢失。

文献[20]报道的间接竞争 ELISA 检测方法的检测广谱性与本研究基本一致,对有机磷类农药的检测限为 3.5~162.2 ng/ml,优于本试验的检测限 358.0~1 776.0 ng/ml。但是本研究建立的 ELISA 方法中,用抗独特型抗体与农药小分子竞争替代了人工抗原与农药小分子的竞争,绕过了人工抗原的合成,降低了有机溶剂和半抗原对环境对人体健康的威胁,是一种环境友好绿色的免疫检测方法。本试验成功筛选到能够模拟抗原 BPB 的噬菌体,建立的检测方法基本能满足对农产品中有机磷类农药初筛检验的要求,并可以用于环境中有机磷农药的监测。下一步试验将进行多肽的可溶性表达,建立基于多肽的检测方法,为金标试纸条的研制提供基础。

## 参考文献:

- [1] 贺锡雯,吕京. 有机磷类和拟除虫菊酯类农药的神经毒作用机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(2): 89-90.
- [2] 林春绵,胡晓燕,张安平. 酶抑制法快速检测有机磷农药残留的研究进展[J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(4): 386-391.
- [3] BERIJANI S, SADIGH M, POURNAMDARI E. Homogeneous liquid-liquid microextraction for determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples prior to gas chromatography-flame photometric detection[J]. Journal of Chromatographic Science, 2016, 54:1061-1067.
- [4] SEEBUNRUENG K, SANTALADCHAIYAKIT Y, SRIJARANAI S. Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples[J]. Chemosphere, 2014, 103: 51-58.
- [5] XU Z L, DENG H, DENG X F, et al. Monitoring of organophos-

- phorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1569-1576.
- [6] WANG H, LI G H, CHEN T, et al. Immunoassay for multiple residues of organophosphorus pesticides using broad spectrum of monoclonal antibodies[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015, 6(11): 4399-4408.
- [7] HUA X, WANG L, LI G, et al. Multi-analyte enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus pesticides and neonicotinoid insecticides using a bispecific monoclonal antibody[J]. Analytical Methods, 2013, 5(6): 1556-1563.
- [8] 张小兵,邸禄芹,吴 萌,等. 单克隆抗体与多克隆抗体配对 ELISA 方法比较[J].生物技术通报, 2009(11): 125-129.
- [9] 武爱华,张 霄,刘 媛,等. Cry2 Aa 毒素结合十二肽的筛选与鉴定[J].江苏农业学报, 2015(4): 929-941.
- [10] INABA J, NAKAMURA S, SHIMIZU K, et al. Anti-metatype peptides, a molecular tool with high sensitivity and specificity to monitor small ligands [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 388(1): 63-70.
- [11] BRIGATI J R, PETRENKO V A. Thermostability of landscape phage probes[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(6): 1346-1350.
- [12] SCHWIND P, KRAMER H, KREMSER A, et al. Subtilisin removes the surface layer of the phage fd coat[J]. European Journal of Biochemistry, 1992, 210(2): 431-436.
- [13] JOHNSON H R, HOOKER J M, FRANCIS M B, et al. Solubilization and stabilization of bacteriophage MS2 in organic solvents[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(2): 224-234.
- [14] 贺 江.噬菌体展示技术在食品科学领域的应用进展[J].中国农学通报, 2014,30(24): 303-309.
- [15] 王妍入. 黄曲霉毒素替代物绿色免疫分析研究[D]. 北京:中国农业科学院,2014.
- [16] 杨 威,李小兵,刘国文,等. 几种方法纯化小鼠腹水 IgG2b 类单抗的比较[J].畜牧与兽医, 2011(1): 48-50.
- [17] 张 霄,纪 炜,王 耘,等. 间接 ELISA 法检测苏云金芽孢杆菌(Bt)Cry1Ab 毒蛋白抗体方法的建立[J].江苏农业学报, 2010,26(4): 894-896.
- [18] WRIGHTON N C, FARRELL F X, CHANG R, et al. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin[J]. Science, 1996, 273(5274): 458-463.
- [19] ROSELYNE B, CAROLINE D, BERNARD M, et al. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis[J]. EMBO Journal, 2000, 19(7): 1525-1533.
- [20] 华修德. 有机磷农药单残留及多残留免疫分析方法的建立与应用[D].南京:南京农业大学,2012.

(责任编辑:张震林)