

抗 DDA 抗体的制备及其特性研究

刘仁沿^{1,2,3}, 董玉华⁴, 许道艳^{2,3}, 梁玉波^{2,3}

(1.大连海事大学环境科学与工程学院, 辽宁 大连 116026; 2. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 3. 国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室, 辽宁 大连 116023; 4.大连水产学院水产养殖系, 辽宁 大连 116023)

摘要:制备抗 DDA 抗体,建立间接竞争酶联免疫吸附实验(Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay, icc-ELISA)方法,以测定海水样品和海洋贝类中的有机氯农药滴滴涕(DDT)代谢产物。采用碳二亚胺法,将半抗原 DDA 分别与载体蛋白牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)和卵清蛋白(Ovalbumin, OVA)偶联,得到完全抗原。以 DDA-BSA 为抗原,免疫 BALB/c 小鼠,制备抗 DDA 抗体。研究表明,5 只鼠产生的抗体对 DDA 都能产生灵敏的特异性免疫反应,以 DDA-OVA 为包被抗原,用 5# 抗体建立间接竞争 ELISA 方法检测海水样品和海洋贝类中的有机氯农药 DDT 代谢产物 DDA,最低检出限为:10.0 ng·mL⁻¹,海水加标样平均回收率 122%,批间变异系数 30%,贝类加标样平均回收率为 131%,批间变异系数 22%。

关键词:DDA; DDT; 抗 DDA 抗体; 酶联免疫吸附实验

中图分类号:X592 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)02-0805-08

Preparation and Characterization of Polyclonal Antibody Against DDA

LIU Ren-yan^{1,2,3}, DONG Yu-hua⁴, XU Dao-yan^{2,3}, LIANG Yu-bo^{2,3}

(1.Environmental Science & Engineering College, Dalian Maritime University, Dalian 116026, China; 2.National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023, China; 3.SOA Key Lab of Coastal Environment and Ecosystem Research, Dalian 116023, China; 4. Department of Aquaculture, Dalian Fisheries University, Dalian 116023, China)

Abstract: Organochlorine pesticide 1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDT) is a persistent and broad toxic organochlorine insecticide. DDT is slowly degraded in tissues mainly to 2,2-bis(4-chlorophenyl)acetic acid (DDA). DDT and its decomposition products are ubiquitous micropollutants in seawater and shellfish. This study presents a novel method of preparing the polyclonal antibody against DDA to investigate the levels of DDT and DDA in seawater and shellfish using indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icc-ELISA). Under the presence of N,N-dicyclohexylcarbodiimide, the complete antigen can be obtained by coupling the hapten (DDA) with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA), respectively. The female BALB/c mice were immunized using DDA-BSA as immunogen to prepare the polyclonal antibody against DDA and its characterization was studied. The results indicated that the antibodies produced from five mice immunized possessed highly sensitive and specific immune reaction for DDA. Using DDA-OVA as coating antigen, the 5# antibody was employed to develop the icc-ELISA method to investigate the concentrations of DDA in seawater and shellfish. The limit of detection (LOD) of the method was 10.0 ng·mL⁻¹. The average recovery and coefficient of variation (CV) were 122% and 30% for seawater, and 131% and 22% for shellfish, respectively.

Keywords: DDA; DDT; polyclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

有机氯农药滴滴涕(1,1,1-trichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane, DDT)是 1939 年由 Muller 博士发

现的,并因此获得诺贝尔奖。DDT 作为广谱杀虫剂曾经在 20 世纪 50 年代被大量使用。这一类含氯原子的有机合成杀虫剂,具有极高的脂溶性和稳定性,可在生物体内富集很高的浓度,在环境中降解缓慢,属持久性有机污染物。市售 DDT 含 3 种异构体:pp'-DDT (85%),op'-DDT (15%)和极微量的 oo'-DDT。DDT 在沉积物中的两种主要分解物是 2,2-双(4-氯苯基)-1,1-二氯乙烯(DDE)和 2,2-双(4-氯苯基)-1,1-二

收稿日期:2007-06-20

基金项目:国家 863 计划(2002AA635150);国家 863 计划(2006AA09 Z163);国家专项(908-01-ZH3)

作者简介:刘仁沿(1963—),女,辽宁省辽中县人,研究员,硕士,生物化学专业,从事海洋环境化学和生物化学工作。

E-mail:ryliu@nmemc.gov.cn

通讯联系人:梁玉波 E-mail:ybliang@nmemc.gov.cn

氯乙烷 (DDD);DDD 本身也被用做杀虫剂;DDT 在动物组织内可以缓慢降解为 2,2-双(4-氯苯基)乙酸 (DDA);DDA 本身并不积累,而是作为人或动物与 DDT 暴露接触的指标,已报道尿液中 DDA 的含量可以用作人或哺乳动物暴露接触 DDT 的灵敏指标^[1,2]。在昆虫体中 DDT 被微生物氧化为三氯杀螨醇 (2,2,2-trichloro-1,1-bis-(4-chlorophenyl)ethanol, Dicofol)。

DDT 及其代谢产物 DDD、DDE 等属于环境内分泌干扰物质,损害动物的神经和生殖系统,长期暴露对肝脏有损害,因此 70 年代已被发达国家禁止使用,但由于其价格低廉、杀灭蚊虫效果显著,至今在一些发展中国家,包括我国的个别地区仍在用;DDT 的羟基同系物三氯杀螨醇(Dicofol)作为农业杀虫剂尚未被禁用,它含有不低于 5%的 DDT;因此在食品、环境样品中甚至南北极仍能检出 DDT 和它的代谢物^[3-6]。DDT 及其代谢物的常规分析方法主要有气相色谱法结合质谱和电子捕获检测器(GC/MS、GC/FLD),该方法不仅需要昂贵的仪器设备和专业的分析人员,而且样品的前处理过程繁琐复杂,不易满足大批量样品的检测分析需要,也不适用于现场分析。近年来得到快速发展的免疫分析技术,以其特异性

强、灵敏度高、操作简便、检测迅速和分析成本低的优点被广泛应用于各种有机污染物的分析^[7-17]。

国内关于 DDT 代谢物的 ELISA 分析报道尚不多见,尚未见其他研究者关于 DDT 代谢物 DDA 的 ELISA 分析报道^[12]。本文制备鼠抗体,研究其特性并建立检测海水样品和海洋贝类中的有机氯农药 DDT 代谢产物 DDA 的间接竞争 ELISA 方法。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

BALB/c 小鼠购自大连医科大学实验动物中心;DDA、水溶性碳化二亚胺 EDC[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carboimide hydrochloride]、N-羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide, NHS)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白(OVA)、Freund's 完全和不完全佐剂、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)均购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 购自华美公司;pp'-DDT、pp'-DDD、pp'-DDE 和 pp'-DDDE (2,2-bis (4-chlorophenyl)-1-chloroethylene-2-chloro-1,1-bis(4-chlorophenyl)-ethene)购自国家标准物质中心。Thermolabsystems 酶标仪和洗板机, JASCO V-550 紫外/可见分光光度计。

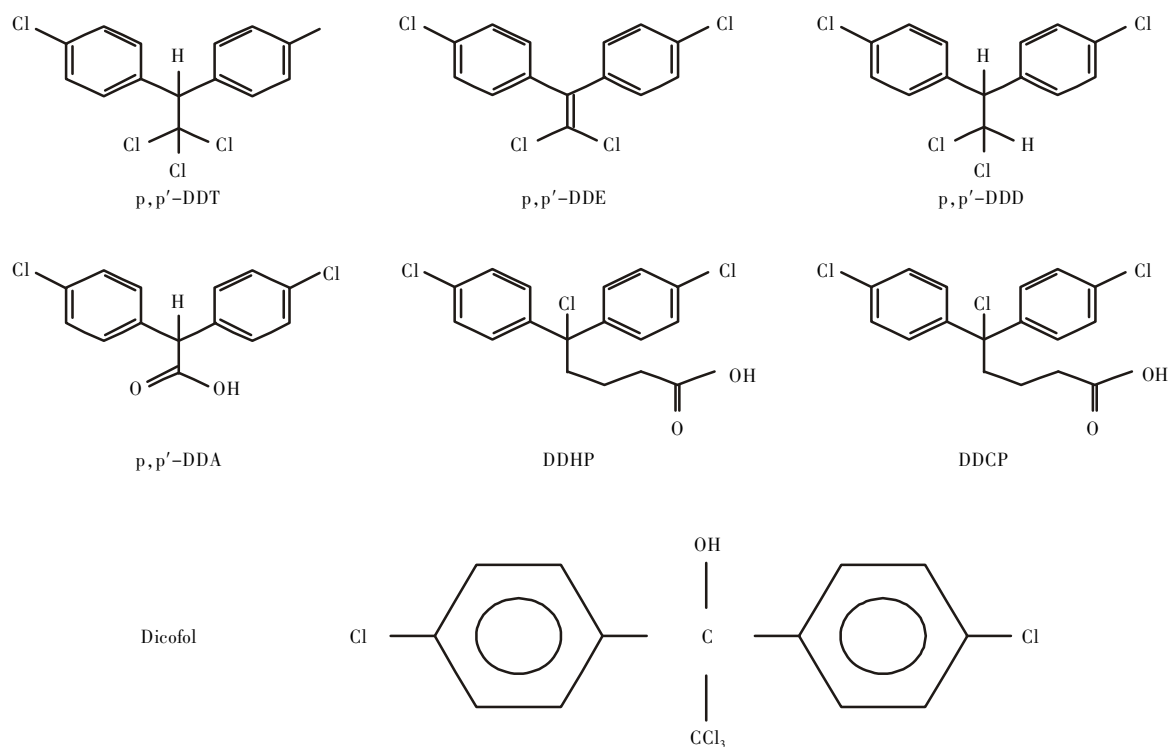


图 1 DDT 及同系物的化学结构

Figure 1 The structure of DDT and its metabolites

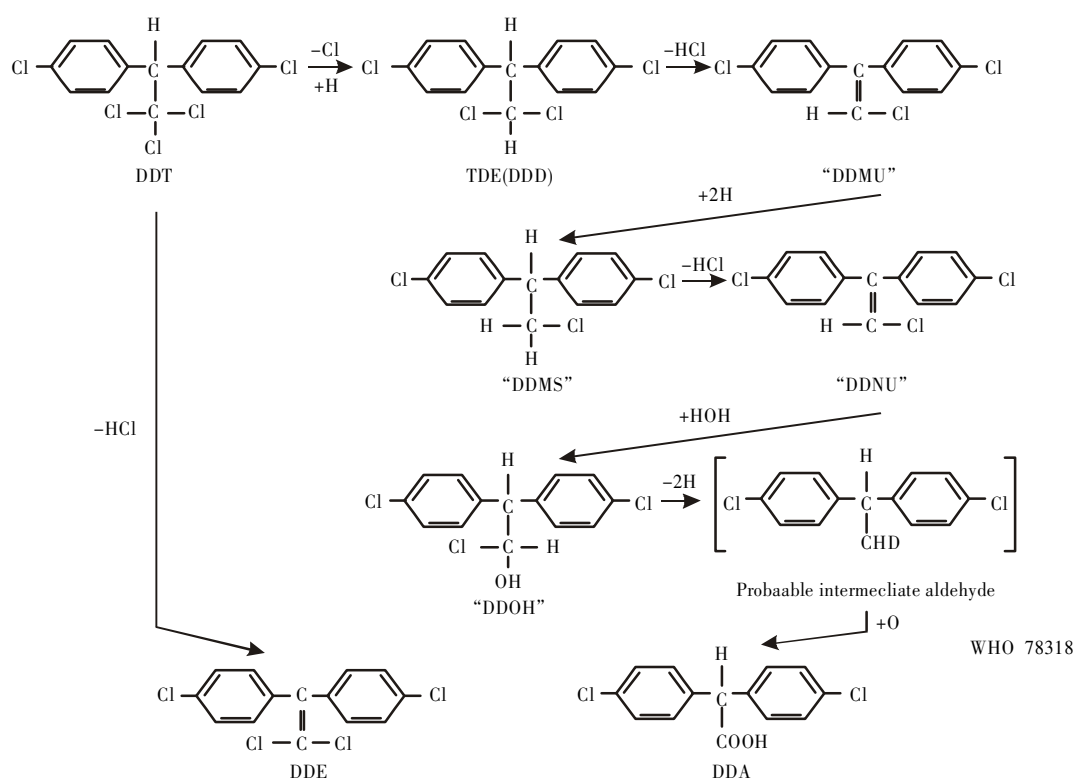


图 2 DDT 的代谢及产物

Figure 2 The metabolism and metabolic products of DDT

1.2 方法

1.2.1 半抗原-载体蛋白偶联物的合成

半抗原 DDA 与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 和卵清白蛋白(OVA)偶联方法见作者已发表文献[12]。测定反应前后自由氨基数,计算偶联比。

1.2.2 免疫小鼠制备多抗血清

以 DDA-BSA 为抗原,免疫 5 只 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠。首次免疫用 DDA-BSA 与等体积完全弗氏佐剂,充分乳化制成乳浊液,腹腔注射小鼠,第 3、5、7、9、11 周取同量 DDA-BSA 与等体积不完全弗氏佐剂充分乳化,腹腔注射。取尾血,用 ELISA 方法测定效价。取同量 DDA-BSA 的 PBS 溶液腹腔注射加强免疫,3 d 后杀死小鼠取血,静置沉降,离心,取上层血清,加等体积甘油,分装,−20℃ 保存待用。

1.2.3 酶联免疫吸附方法(ELISA)测定血清效价

DDA-OVA 作为包被抗原,碳酸盐缓冲液(pH9.6)稀释,包被 96 孔酶标板,每孔 100 μL,4℃ 过夜;弃去残液,用洗液(PBS-0.1% Tween-20)洗涤 3 次,用 1% 的 PVA-PBS 溶液封闭(每孔 300 μL),37℃ 3 h,保存在 4℃ 待用;测定时,弃去封闭液,洗板 3 次,加入适当稀释的抗血清(每孔 100 μL),37℃ 孵育 1 h;洗板,

加入适当稀释的酶标羊抗鼠第二抗体,37℃ 孵育 40 min;洗板,加底物溶液(邻苯二胺、pH5.0 的磷酸盐-柠檬酸缓冲液和 30% H₂O₂),37℃ 显色 13 min,以 2 mol·L^{−1} H₂SO₄ 中止反应,492 nm 波长测量 OD 值。

1.2.4 DDT 系列物标准溶液配制

用甲醇溶解 DDA、pp'-DDT、pp'-DDE、pp'-DDD 和 pp'-DDDE 等,配成 5.0 mg·mL^{−1} 的储备液,用 PBS 稀释成各浓度的使用液:2.5、25、50、100、250、500、800 ng·mL^{−1} 和 1.0、50、250、500、800 μg·mL^{−1}。

1.2.5 间接竞争酶联免疫吸附方法(idc-ELISA)分析 DDT 代谢物

96 孔板的包被和封闭同血清效价测定。弃去封闭液,洗板 3 次,加入 50 μL 系列稀释的各种标准物质溶液或海水或贝类萃取液,加入 50 μL 适当稀释的多抗血清,振摇混匀,室温放置 30 min,其他步骤同血清效价测定。根据各标准物质溶液的浓度和吸光度值计算每种标准物质的 50%抑制浓度 IC₅₀(抑制率 Bo-B/Bo=50%对应的标准物质浓度)、交叉反应率(以 DDA 的 IC₅₀ 为 100%,DDA 的 IC₅₀ 与其他标准物质 IC₅₀ 的百分比)和灵敏度(导致空白对照光度值降低 0.1 对应的各标准物质溶液浓度)。

2 实验结果

DDA-BSA 和 DDA-OVA 的偶联分子比分别是 34:1 和 16:1。免疫 6 次,从 5 只被免疫的鼠得到的抗体,对非相关蛋白偶联 DDA-OVA 包被抗原的效价全部超过 1:80 000(见表 1)。

表 1 5 只鼠抗体的效价

Table 1 Titers of antisera prepared from five immunized mice by idc-ELISA

鼠编号	效价
1#	1 : 120 000
2#	1 : 100 000
3#	1 : 140 000
4#	1 : 120 000
5#	1 : 80 000

5 种抗血清对不同的 DDT 同系物的特异性和亲和性是不同的。对 DDA 都具有比较高的抑制率和灵敏度(见图 3);得到的 5 种抗血清对包被抗原 DDA-OVA 和自由的 DDA 分子都具有合适的束缚亲和性;在 $OD_{492\text{ nm}}$ 值或抑制率与浓度或其对数值之间都具有很好的线性回归关系,但线性范围各不相同;1#、3#、4# 和 5# 鼠产生的抗体所建立的 idc-ELISA 分析 DDA 的方法都具有较好的灵敏度,特别是 4# 抗血清具有最低的检出限,4# 抗血清对 DDA 的灵敏度最高为 $1.3\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (见表 2)。

1#、2#、3# 和 4# 抗血清对 pp'-DDT 的亲和束缚

反应模式基本相似,对低浓度的 pp'-DDT 抗原,都不具有特异的亲和性,4 种多抗血清只对很高浓度的 pp'-DDT(大于 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),才有随浓度增加显示增大的抑制作用(见图 4)。

表 3 显示的是用 4# 抗血清建立的 idc-ELISA 方法分析五种 DDT 系列物的交叉反应率、灵敏度和 50%的抑制浓度;4# 抗血清对 pp'-DDT、pp'-DDDE、pp'-DDE 和 pp'-DDD 的交叉反应都很小。尽管对 pp'-DDDE 具有一个最高的 50%抑制浓度,但是却显示了很好的抑制趋势和计量响应关系(见图 5),这可能是因为 4# 抗血清对包被抗原 DDA-OVA 具有比 pp'-DDDE 更强的亲和性。

2# 抗血清对 pp'-DDE 的亲和反应与对 pp'-DDT 相似,对低浓度的 pp'-DDE 抗原不具有特异的亲和性;在极高的浓度下($>500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),才产生明显的抑制趋势,抑制率和浓度的对数值具有很好的线性回归关系(图 5)。4# 多抗血清对 pp'-DDE 的亲和反应灵敏度高一些,当 pp'-DDE 的浓度 $>450\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,对 4# 多抗血清开始产生抑制趋势(图 5)。

2# 和 4# 抗血清对 pp'-DDD 的亲和反应与对 pp'-DDT 相似,对低浓度的 pp'-DDD 抗原不具有特异的亲和性;抑制率很小,在极高的浓度下($>500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),才产生明显的抑制趋势。抑制率与浓度的对数值具有很好的线性回归关系(图 5)。

2# 和 4# 抗血清对 pp'-DDDE 的亲和反应也表现为,对低浓度的 pp'-DDDE 抑制率较小,在高浓度

表 2 测定 DDA 的灵敏度及回归方程

Table 2 The sensitivity and significant linear regression of DDA

抗体编号	回归方程	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	灵敏度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归系数	P
1#	$Y=0.291\ 4X+0.092\ 4$	0.02	2.5	0.986 8	$P<0.01$
2#	$Y=0.360\ 2X+0.987\ 2$	7.94	1 584.9	0.992 1	$P<0.01$
3#	$Y=0.405\ 7X-1.123\ 9$	0.551	6.3	0.997 5	$P<0.01$
4#	$Y=0.113\ 9X+0.779\ 7$	0.501	1.3	0.994 7	$P<0.01$
5#	$Y=0.117X+0.232\ 5$	0.156	10.0	0.976 7	$P<0.01$

Y: Bo-B/Bo; B, the $OD_{492\text{ nm}}$ value of analyst; Bo, the $OD_{492\text{ nm}}$ value of 50uL antiserum.

X: log the concentration of analyst ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$).

表 3 4# 抗血清对 5 种系列物的交叉反应率等

Table 3 Cross-reactivity of 4# antiserum against each derivant

分析物	$IC_{50}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	交叉反应率	灵敏度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
DDA	0.501	100.0	1.3
pp'-DDT	158.5	0.4	100 000.0
pp'-DDDE	398.1	0.2	10.0
pp'-DDE	10.0	5.01	630.0
pp'-DDD	100	0.5	31 623.0

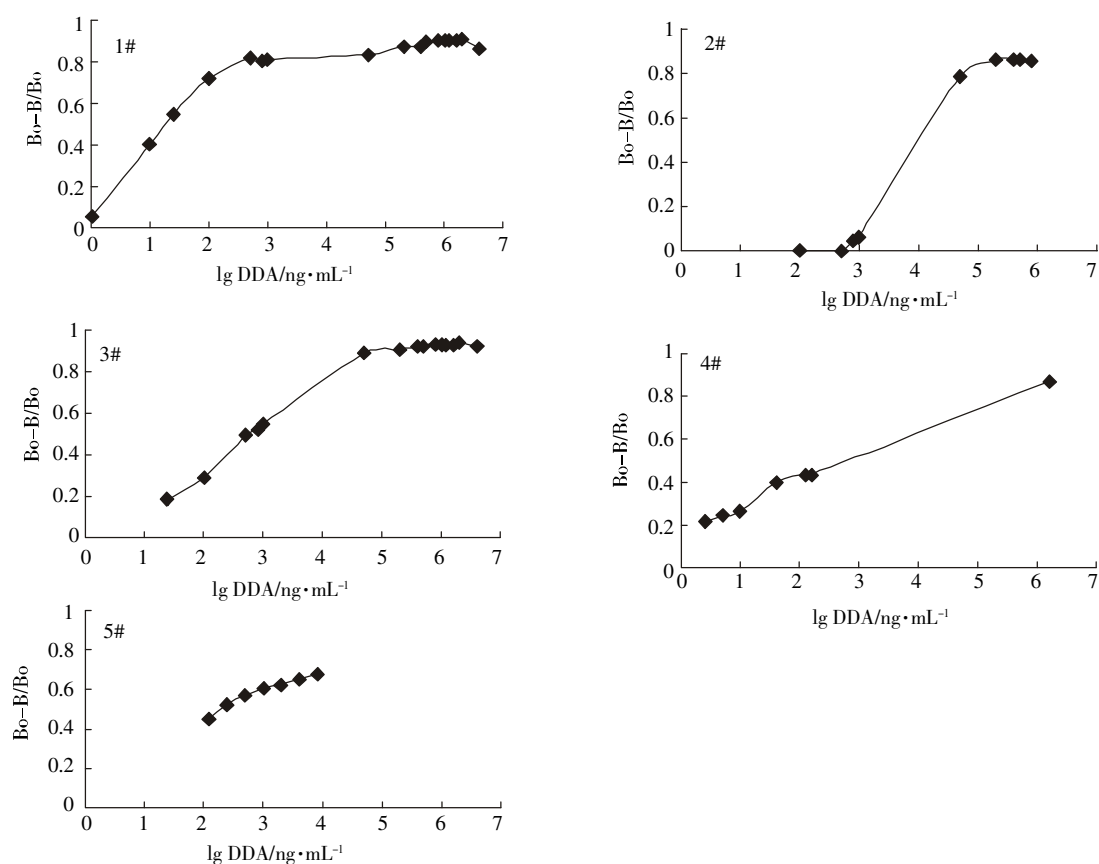
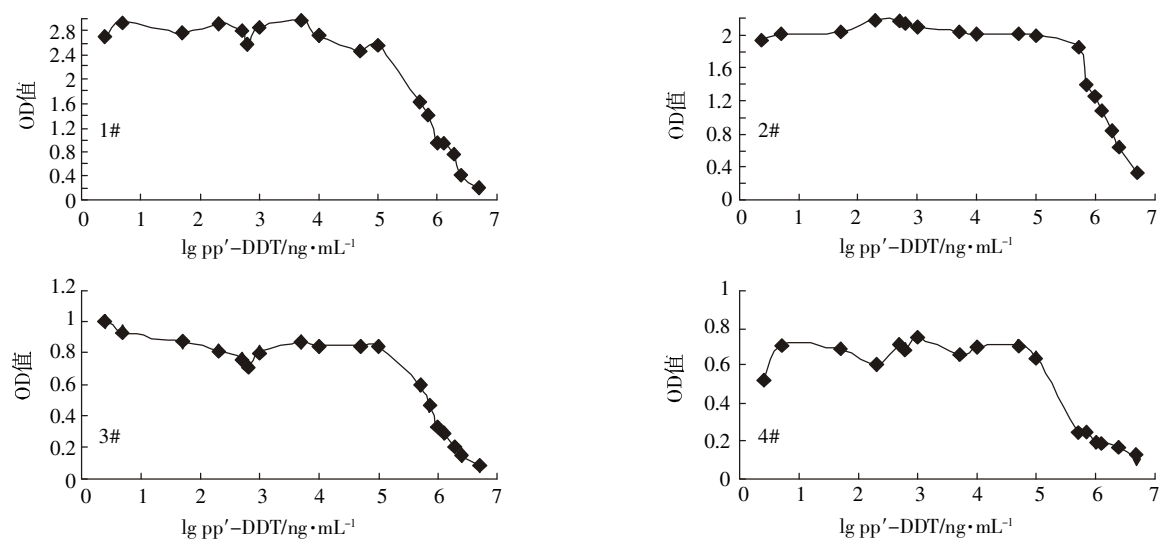


图 3 5 种抗血清对 DDA 的抑制曲线

Figure 3 The inhibition curves of antisera against DDA

图 4 4 种抗血清对 $\text{pp}'\text{-DDT}$ 的抑制曲线Figure 4 The inhibition curves of antisera prepared from four immunized mice against $\text{pp}'\text{-DDT}$

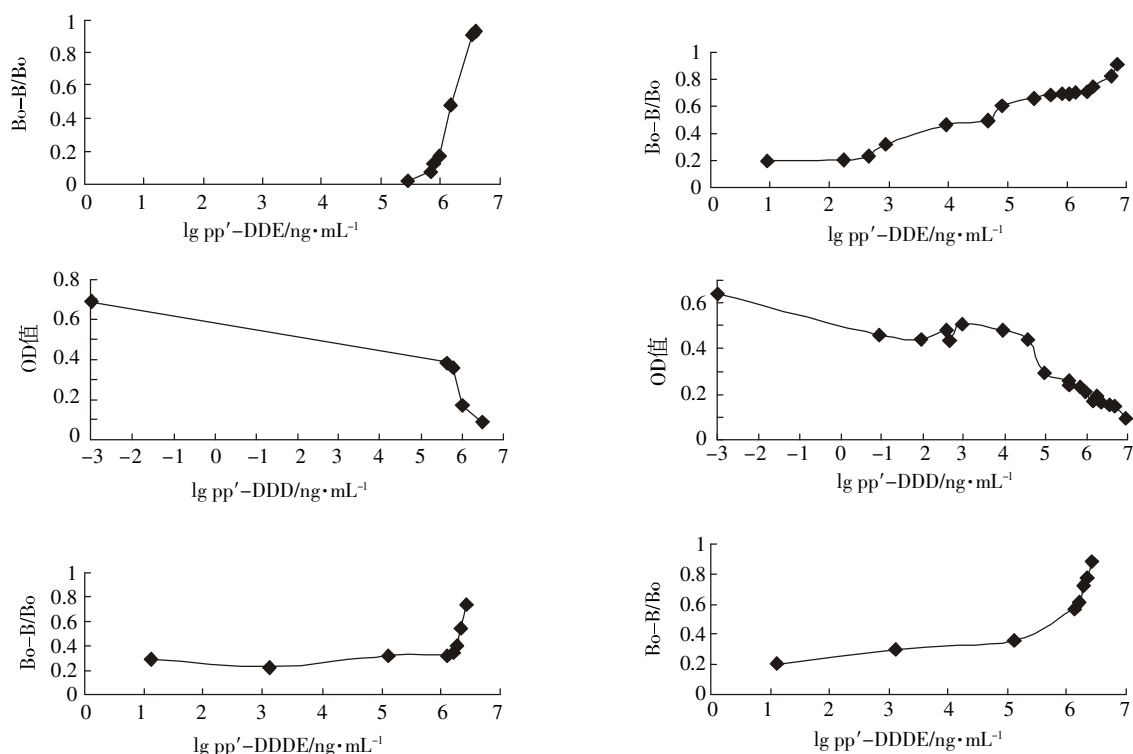


图5 2#和4#抗血清对 pp'-DDE、pp'-DDD 和 pp'-DDDE 的抑制曲线

Figure 5 The inhibition curves of 2# and 4# antisera against pp'-DDE, pp'-DDD, pp'-DDDE

下($>1\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),产生明显增大的抑制趋势,而且抑制率与浓度的对数值都具有非常好的线性回归关系;4#多抗血清对 pp'-DDDE 具有特异的亲和反应,只是在低浓度下,抑制率与浓度的对数值的回归直线斜率小(图5)。

用5#多抗血清建立的 idc-ELISA 方法,实验了 DDA 添加到海水和扇贝匀浆中的回收率(见表4和表5)。低浓度的回收率太高($>150\%$),变异系数太大($>30\%$); $50\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $100\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的添加浓度得到很好的回收率和变异系数,能满足分析方法的要求。

3 讨论

抗体的亲和反应特性是建立灵敏 ELISA 检测方法的关键因素之一,抗体对自由的分析物和作为包被抗原偶联到载体上的分析物必需具有合适的亲和束缚性,才能用来建立合适的检测方法。从5只鼠中得到的抗体对自由的 pp'-DDT、pp'-DDE 和 pp'-DDD 的亲和性都比对偶联的 pp'-DDT、pp'-DDE 和 pp'-DDD 的亲和性小,抗体与偶联抗原的复合物不能被自由的抗原替代,只有当自由形式的分析物浓度很高时,才能竞争得到抗体,检测反应的灵敏度就低;而它

们对自由的 DDA 都表现出很强的亲和性,在低浓度时就表现出较高的抑制率,因此都能用来建立灵敏的 DDA 分析方法。要想得到优良的抗体,建立灵敏的酶联免疫分析实验方法,抗原的设计是关键步骤。因为 DDT 分子结构中没有可用于连接蛋白载体的活性基团,因此选择利用 DDA 的羧基偶联到蛋白上作为抗原。可能是因为用 DDA-BSA 做抗原,所以5只鼠产生的抗体对 DDA 的亲和识别能力最强,分析方法的灵敏度最高。

使用同一种抗原,从5只鼠得到的抗体效价不同;对 DDA 都具有比较强的特异性结合,但半抑制浓度和灵敏度也都不同;对 pp'-DDT、pp'-DDE、pp'-DDD 和 pp'-DDDE 4种抗原的抑制趋势基本一致,高浓度时才表现明显的结合,但抑制曲线也是各不相同的;Ji Youn Hong 等^[14]使用同样的免疫原,得到对 DDA 和 pp'-DDT 识别能力都强的抗体;可见使用同一种抗原,但由于动物之间存在极大的个体差异,或者因为抗原的纯度有区别,产生的抗体是有差异的。

从5只鼠中得到的抗体都不能用来建立检测 DDT、DDE、DDD 的方法,因为在环境中极少有如此高浓度的沾污样品;用4#多抗血清建立的 ELISA 方法

表 4 海水中 DDA 添加的回收率(5#)

Table 4 Recovery rate of DDA spiked to sea water determined by idc-ELISA using 5# antiserum

添加 DDA 浓度/ng · mL ⁻¹	测定浓度/ng · mL ^{-1a}	回收率/%
25	42 ± 13(32%)	168
50	49 ± 10(20%)	98
100	100 ± 10(10%)	100

a: value= mean ±SD; value in parentheses represents coefficients of variation; n=6.

表 5 扇贝中 DDA 添加的回收率(5#)

Table 5 Recovery rate of DDA spiked to scallops determined by idc ELISA using 5# antiserum

添加 DDA 浓度/ng · mL ⁻¹	测定浓度/ng · mL ^{-1a}	回收率/%
25	45 ± 16(37%)	180
50	62 ± 11(19%)	124
100	89 ± 10(11%)	89

a: value= mean ±SD; value in parentheses represents coefficients of variation; n=6.

分析 DDA 的有效范围:1.3~2 000 ng·mL⁻¹; 对于海水检出限是 1.3 ng·mL⁻¹;对于贝类检出限是 12.5 ng·g⁻¹。ELISA 反应容易高估样品中分析物的浓度,而且在低浓度范围结果的变异大,这与 Aurelja 和 An-ping Dong 报道^[16,18]的结果是一致的,可能由于各种影响因素对低浓度值的结果导致的偏差更大,而产生低添加浓度的回收率偏高的现象,如果将抗体从血清中提纯,可能会得到更好的结果。

影响 ELISA 检测结果的因素很多,主要是抗体的性质和样品的介质效应(海水、扇贝萃取液等)。因此提高样品的稀释倍数,会减小介质的干扰效应。用免疫多克隆抗体建立的 ELISA 分析 DDA 方法可以应用于实际样品的测定,能够满足分析要求。

DDT 和它的降解产物 DDD 和 DDE 在各生态系统中的规律研究比较彻底,可对 DDT 的主要代谢物 DDA 还没有引起关注。有关的研究比较少,特别是在海洋环境中的存在及其规律很少见报道,自从 Heberer 等^[19]报道在 Berlin 表面海水中检测出高浓度的 DDA,DDA 在海洋环境中的存在应该引起关注。建立 DDA 的分析方法,研究了解 DDA 的存在规律,对于全面理解 DDT 在环境中包括海洋环境中的归宿是非常必要的。

ELISA 检测法可以代替传统的生物小鼠法,用于大批量样品的筛选,对于阳性样品,再进行复杂的仪器分析,是一种有用的检测有机氯农药 DDT 及其代谢物的技术,不仅为农业产品、环境样品中有机污染物的分析提供了灵敏、快速和简便的分析方法,也为建立其他小分子有机污染物质的检测方法提供了可借鉴的途径。

参考文献:

- [1] Banerjee B D. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of DDA (2,2-bis(p-chlorophenyl) acetic acid) in urine[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1987, 38(5): 798-804.
- [2] Hassall K A. The Biochemistry and Uses of Pesticides, 2nd ed.; VCH[M]. Weinheim, Germany, 1990, 169.
- [3] 冯海波,杨忠芳,陈岳龙,等. 水稻及其根际土壤中六六六、滴滴涕残留探析[J]. 中国生态农业学报, 2006, 14(3): 145-147.
FENG Y M, YANG Z F, Chen Y L, et al. Study on the residues amount of hexachloro-cyclohexane and dichlorodiphenyl trichloroethane in rice and its rhizosphere soil[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2006, 14(3): 145-147. [in Chinese]
- [4] 章海波,骆永明,赵其国,等. 香港土壤研究 IV. 土壤中有机氯化物的含量和组成[J]. 土壤学报, 2006, 43(2): 220-225.
ZHANG H B, LUO Y M, ZHAO Q G, et al. HONG Kong soil researches IV. Contents and compositions of organochlorines in soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(2): 220-225. [in Chinese]
- [5] 陈伟琪,洪华生,张路平,等. 珠江口表层沉积物和悬浮颗粒物中持久性有机氯污染[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, 40(z1): 230-235.
CHEN W Q, HONG H S, ZHANG L P, et al. Persistent Organochlorine Pollutants in Surface Sediments and Suspended Particulate Matter of Zhujiang River Estuary[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2004, 40(z1): 230-235. [in Chinese]
- [6] 甘居利,贾晓平,林 钦,等. 南海北部陆架海域枪乌贼中六六六和 DDT[J]. 海洋环境科学, 2006, 25(z1): 20-24.
GAN J L, JIA X P, LIN Q, et al. BHC and DDT in the squids in continental shelf of northern South China Sea [J]. *Marine Environmental Science*, 2006, 25(z1): 20-24. [in Chinese]
- [7] 吴慧明,杨 挺,宋国念. 土壤中克百威残留检测直接竞争 ELISA 试剂盒的研制[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003, 29(6): 634-638.
WU H M, YANG T, SONG G N. Development of the detection direct

- ELISA kit for carbofuran residue in soil[J]. *Journal of Zhejiang University(Agric. & Life Sci)*, 2003,29(6):634-638. [in Chinese]
- [8] 焦奎,张书圣. 酶联免疫分析技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2004.8.
- JIAO K, ZHANG S S. Technology and Application of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [M].Beijing: Chemical Industry Press, 2004. [in Chinese]
- [9] Jerome N, Andrea B, Carmelo T. A Competitive ELISA to Detect Breve-toxins from *Karenia brevis*(Formerly *Gymnodinium breve*) in Seawater, Shellfish, and Mammalian Body Fluid [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002,10(2):179-185.
- [10] Si-Wu Fu, Ya-Li Zhang, Dian-Yuan Zhou. Development of an ELISA Kit using monoclonal antibody to *Clostridium difficile* toxin A [J]. *World J Gastroenterol*, 2004,10(18):2747-2749.
- [11] Won Chul Park, Yuong Ae Cho, Yoo Jung Kim. Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Insecticide Bromophos [J]. *Bull Korean Chem Soc*,2002,23(10):1399-1403.
- [12] 董玉华,刘仁沿,许道艳,等. 酶联免疫吸附方法分析海水和贝类中的滴滴涕及代谢物[J]. 水产科学,2007,26(4):229-233.
- DONG Y H, LIU R Y, XU D Y, et al. Detection of DDT in Seawater and Shellfish Using Indirect Competitive ELISA [J]. *Fisheries Science*, 2007,26(4):229-233. [in Chinese]
- [13] Igor Hochel, Marek Musil. Development of an Indirect Competitive ELISA of DDT[J].*Food and Agricultural Immunology*,2002,14(4):285-300.
- [14] Ji-Youn Hong, Jong-Hyun Kim, Song-Ja Park, et al. Production and Characterization of DDT Antibodies and Its Application to Enzyme Immunoassay: Relation of Response and Affinity to Coating Ligand.Bull [J]. *Korean Chem Soc*, 2003,24(11):1605-1608.
- [15] Britt M Maestroni, John H Skerritt, Ian G Ferris, et al. Analysis of DDT Residues in soil by ELISA: An International Interlaboratory Study [J]. *Journal of AOAC International*, 2001,80(1):134-142.
- [16] An-ping dong,Vladimir K, Robert Ulrich, et al. Direct competitive ELISA for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples[J].*Anal Bioanal Chem*, 2002,373:685-690.
- [17] Igor Hochel, David Viochna, Marek Musil. Determination of DDT in model samples by using solid-phase extraction and indirect competitive enzyme immunoassay[J]. *Food and Agricultural Immunology*,2003, 15(3-4):183-195.
- [18] Aurelja T,Silvio S,Milena B,et al.Diarrhoeic Shellfish Toxins in Adriatic Sea Mussels Evaluated by an ELISA Method[J].*Toxicon*, 1992,30(5/6):673-676.
- [19] Thomas Heberer, Dunnbier U. DDT Metabolite Bis(Chlorophenyl)acetic Acid: The Neglected Environmental Contaminant[J].*Environ Sci Technol*, 1999,33 (14):2346-2351.