

· 研究论文 ·

三唑磷酶联免疫吸附测定法中包被 抗体稳定剂的研究

桂文君¹, 梁赤周^{1,2}, 王姝婷¹, 王春梅¹, 朱国念^{*1}

(1. 浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029; 2. 浙江来益生物技术有限公司, 浙江 嵊州 312400)

摘要: 选择了甘油、山梨醇、聚乙二醇(PEG)、卵清蛋白(OVA)、多肽、糖、氨基酸等试剂, 通过经验法和正交法相结合的手段配制了一系列稳定剂, 对吸附在酶标板上的三唑磷多克隆抗体进行处理(37℃, 1 h)后, 再在 37℃下连续贮存 7 d, 利用直接竞争 ELISA 法对不同稳定剂处理的包被抗体免疫活性、亲合性及检测灵敏度进行检测, 并与未经稳定剂处理的对照进行比较, 筛选得到效果较好的稳定剂 1(质量分数: 甘油 2.5%, 氨基酸 1.5%, 蛋白胨 3.0%, 离子螯合剂 0.1%, 防腐剂 0.01%)。用稳定剂 1 处理包被抗体后, 4~6℃下保存半年及 37℃下保存 14 d 的试验结果表明, 抗体的活性相对保持率分别为 97.8% 和 94.2%; 其免疫活性、亲合性(I_{50} 分别为 68.43 和 54.38 ng/mL)及灵敏度(I_{10} 分别为 3.72 和 3.22 ng/mL)与常规方法包被的抗体(包被好后不贮存, 直接检测, I_{50} 为 60.73 ng/mL, I_{10} 为 3.11 ng/mL)无明显差异; 冻融试验表明, 经稳定剂 1 处理的三唑磷抗体在反复冻融次数不超过 8 次时其活性也是稳定的。说明筛选出的稳定剂可以显著提高三唑磷多克隆包被抗体的稳定性, 可用于三唑磷 ELISA 试剂盒的生产。

关键词: 酶联免疫吸附测定法; 稳定剂; 三唑磷; 多克隆抗体

中图分类号: R 392.11

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)02-0165-07

Study on the Stabilizers for Coated Antibodies in ELISA of Triazophos

GUI Wen-jun¹, LIANG Chi-zhou^{1,2}, WANG Shu-ting¹, WANG Chun-mei¹, ZHU Guo-nian^{*1}

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

2. Zhejiang Health Creation Bio-tech Co. Ltd, Shengzhou 310024 Zhejiang Province, China)

Abstract Mixtures of glycerol, sorbitol, amino acid, peptide, peptone, protein, chelator, antiseptic and so on as stabilizers were designed and prepared by means of experimental and orthogonal method. The anti-triazophos polyclonal antibodies (PAbs) coated on 96 micropates were treated with these stabilizers individually (37℃, 1 h), then stored at 37℃ for 7 days. The immunoactivities of the PABs were determined by direct competitive ELISA. PABs were found to be stabilized under 3 stabilizers. After the further investigation of comparing the immunoactivity, the affinity and the detection limit of the PABs which treated with the three stabilizers individually, an optimized stabilizer was then selected. That was stabilizer 1 (m/m; glycerol 2.5%, amino acid 1.5%, peptone 3.0%, chelator 0.1%, antiseptic agent 0.01%). When the incubation of coated PABs were in the presence of the stabilizer 1, with storage at 4~6℃ for half a year or 37℃ for 14 days, the relative immunoactivity was 97.8%

收稿日期: 2007-01-17 修回日期: 2007-04-08

作者简介: 桂文君(1973-), 男, 浙江桐庐人, 博士研究生, E-mail gwj7701@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, 主要从事农药残留其免疫化学研究. 联系电话: 0571-86971220 E-mail zhuguan@zju.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370944)

and 94.2%, respectively. And the affinity (I_{50} 68.43 and 54.38 ng/mL, respectively) and the detection limit (I_{10} 3.72 and 3.22 ng/mL, respectively) remained almost the same as those of the PABs which were just coated on the plate without storage (I_{50} 60.73 ng/mL, I_{10} 3.11 ng/mL). Freeze-thaw test also demonstrated that the optimized stabilizer 1 was fit for the PABs when the freeze-thaw was not more than 8 times. It indicated that the optimized stabilizer could improve the coated PABs' stability evidently, and could be applied to the production of the triazophos ELISA kit.

Key words enzyme-linked immunosorbent assay; stabilizer; triazophos; polyclonal antibody

三唑磷 [triazophos, O, O-二乙基-O-(1-苯基-1, 2, 4-三唑-3-基) 硫代磷酸酯] 是一种广谱性杀虫杀螨剂, 对危害粮、棉、油、果蔬、茶叶等主要农作物的害虫具有良好的防治效果^[1], 但对鱼类、蜜蜂、家蚕具有高毒性^[2]。目前国外已经开始限制或禁止其使用和销售^[3]。我国在甲胺磷、对硫磷等高毒有机磷杀虫剂被限制或禁止使用后, 三唑磷的使用量迅速增加, 环境和食品中三唑磷的残留问题也日益受到人们的关注^[4-9]。建立三唑磷残留的快速检测技术, 对加强三唑磷残留的检测与监控, 保障人类身体健康具有重要意义。近年来发展起来的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 具有很高的特异性和灵敏度, 同时又具有快速、简便的特点, 广泛应用于环境监测、医疗诊断、生化研究等领域^[10-11]。本实验室已经成功开发出三唑磷残留检测直接竞争 ELISA 试剂盒, 并且已经进入商品化阶段。ELISA 试剂盒进行商品生产的关键技术之一是使试剂盒在保存期 (6~12 个月) 内包被在酶标板上的抗体 (或抗原) 免疫活性不发生变化。国外相关公司已经解决了这方面的问题^[10-12], 但出于商业保密的原因, 对其中稳定剂的报道却极少。本研究在三唑磷 ELISA 检测抗体包被稳定剂方面进行了一些探索, 以期对试剂盒商品化生产打下基础, 同时也为其他试剂盒的研制提供方法。

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料

三唑磷标准品 (99.2%, 农业部环境保护监测所); 辣根过氧化物酶 (HRP, 华美生物工程公司); 卵清蛋白 (OVA, MW 45000, 华美生物工程公司); 牛血清蛋白 (BSA, MW 67000); 邻苯二胺 (OPD, 中国五联化工厂); N, N-二甲基甲酰胺 (DMF, 杭州双林化工试剂厂); N, N-二环己基碳二亚胺 (DCC, 上海松江茶花胶粘厂); N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 中国医药集团上海化学试剂公司);

甘油、山梨醇、聚乙二醇 (PEG)、胺类、多肽类、糖类、氨基酸类、防腐剂类、离子螯合剂类 (以上试剂均为市售分析纯); 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4, 0.01 mol/L, 自配); 洗涤液 (PBST, 质量分数为 0.05% Tween-20 PBS, 自配); 底物缓冲液 (无水 Na_2HPO_4 7.36 g 柠檬酸 5.16 g 用双蒸水定容至 1 L, 自配)。底物溶液 [10 mg 邻苯二胺 (OPD) 溶于 25 mL 0.05 mol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠溶液中, 加入 10 μL 30% H_2O_2 混匀, 自配]。

实验动物为雄性新西兰杂交大白兔 (浙江省中医学院动物实验中心)。

1.2 仪器和设备

酶标仪 BD-RAD Model 68 (BIO-RAD 公司); WHS 型智能恒温恒湿培养箱 (宁波江南仪器厂); 电热恒温培养箱 (南京电器三厂); DEM- 自动酶标洗板机 (北京拓普分析仪器有限公司); 96 孔聚苯乙烯酶标板 (Costar 美国); 各式移液枪 (Eppendorf 德国)。

1.3 三唑磷半抗原的合成

采用 4-氨基己酸和 6-氨基己酸作为起始原料, 合成了 O-乙基-O-[1-苯基-(H-1, 2, 4-三唑-3-基), N-(3-羧基-丙基)] 硫代磷酸胺 (简称 THBu) 和 O-乙基-O-[1-苯基-(H-1, 2, 4-三唑-3-基), N-(5-羧基-丙基)] 硫代磷酸胺 (简称 THHe) 两个半抗原^[13] (图 1)。本文选用的是 THHe。

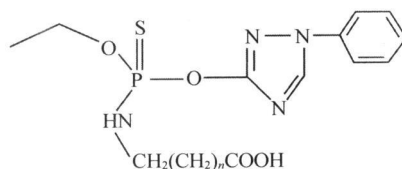


图 1 三唑磷半抗原结构式 ($n=2$ THBu, $n=4$ THHe)

Fig 1 Molecular structures of triazophos haptens ($n=2$ THBu, $n=4$ THHe)

1.4 抗体的制备与纯化

按文献 [14] 中的方法偶联 THHe-BSA, 免疫

大白兔得到多克隆抗体, 并采用辛酸-硫酸铵二步沉淀法纯化抗体, 制成冻干粉。

1.5 酶标半抗原的制备

将 0.1 mmol 半抗原溶于 1 mL DMF 中, 搅拌下逐滴加入 0.3 mmol NH₂S 反应 15 min 后加入 0.15 mmol DCC, 室温避光反应过夜。4 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 300 μL 缓慢滴加到 6 mL 溶有 30 mg HRP 的 CBS 缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 9.6) 中, 搅拌反应 4 h (避光)。待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 3 次, 再用 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 透析 3 d 每天换透析液 3~4 次。加质量分数为 50% 的甘油 PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L), -20℃ 冻存。

1.6 抗体-酶标半抗原工作浓度

采用方阵试验法测定包被抗体和酶标半抗原稀释度, 确定直接竞争 ELISA 法抗体和酶标半抗原最适工作浓度。选择 OD₄₉₀ 值在 1.3~1.5 之间的抗体-酶标半抗原浓度组合为抗体酶标半抗原的工作浓度。

1.7 抗体亲合性及检测灵敏度

用抗体包被酶标板, 封闭, 加入系列浓度的三唑磷标准溶液 (50 μL/孔) 和经 PBS 缓冲液稀释的酶标半抗原 (50 μL/孔), 37℃ 孵育 1 h 用 PBST 洗涤 4 次, 加入底物溶液 (100 μL/孔), 37℃ 温育 15 min, 加入终止液 (2 mol/L 硫酸溶液, 50 μL/孔), 用酶标仪测定各孔的 OD₄₉₀ 值。以抑制率 I 为纵坐标, 三唑磷浓度为横坐标, 绘制三唑磷抑制免疫反应的标准曲线图。分别求出抑制反应 50% 和 10% 所需的浓度 I₅₀ 和 I₁₀, 以 I₅₀ 来衡量抗体对三唑磷的亲合性, I₁₀ 检测该 ELISA 方法的灵敏度。抑制率 I 按下式计算:

$$I(\%) = \frac{OD_{max} - OD_{mi} - (OD_i - OD_{mi})}{OD_{max} - OD_{mi}} \times 100$$

式中: OD_{max} 为不加药时的吸光值, OD_i 为三唑磷浓度为 i 时的吸光值, OD_{mi} 为空白对照的吸光值。

1.8 稳定剂的筛选

1.8.1 试剂的选择及配制 选择甘油、山梨醇、聚乙二醇 (PEG)、卵清蛋白 (OVA)、胨类、多肽类、糖类、氨基酸类、防腐剂类、离子螯合剂类等试剂, 根据溶解度不同, 用 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液按经验法和正交法相结合的手段配制一系列稳定剂。

1.8.2 包被抗体的处理 在包被上抗体并封闭好的酶标板上分别加入配制的系列稳定剂溶液, 150 μL/孔, 37℃ 下恒温孵育 1 h 酶标板垂直向下甩掉内容物, 在吸水纸上拍干残留液, 装入塑料袋密封。

1.8.3 稳定剂筛选 将上述处理后的酶标板置于 37℃ 恒温箱内, 保存 7 d 同时设置包被抗体未经稳定剂处理的酶标板于 4~6℃ 下存放, 作为对照, 25℃ 存放作为对照。以直接 ELISA 方法检测酶标板的 OD 值。OD 值高, 表示抗体的免疫活性保持较好; OD 值低则表示包被在酶标板上的抗体免疫活性降低或完全失活。选择 OD 值明显高于对照的试剂作为进一步筛选的对象, 以直接竞争 ELISA 方法分别绘制抑制反应标准曲线并计算抗体的亲和性及检测灵敏度, 选择对照组的标准曲线、亲和性及检测灵敏度无影响或影响较小的配方作为稳定剂的最终优化配方。

1.9 稳定剂效果验证

1.9.1 37℃ 加速贮存试验 用筛选出的优化稳定剂处理包被上抗体的酶标板, 设不经稳定剂处理的为对照, 置于 37℃ 恒温箱内。开始时每天放入处理组和对照组, 4 d 后每两天放入处理组和对照组。第 14 d 后全部取出, 室温下平衡 30 min 同时以直接竞争 ELISA 法检测 OD 值, 并对第 14 d 的酶标板作抗体亲合性和灵敏度检测。本试验要求 37℃ 下贮存 14 d 抗体的活性能够保持在贮存前的 80% 以上。

1.9.2 4~6℃ 保存试验 将 1 块包被并封闭好的酶标板中的一半用选择的稳定剂按照 1.8.2 节的方法处理, 另一半不处理, 同时置于 4~6℃ 冰箱内。半年后检测包被抗体的活性、亲合性及灵敏度。

1.9.3 冻融试验

1.9.3.1 酶标半抗原 将可拆卸式酶标板逐条编号 (1~12 号, 每条 8 孔), 按优化工作浓度包被上抗体, 并经稳定剂处理, 密封包装。新制的酶标半抗原分装后 (依次编号 1~8 号) 密封包装酶标板于 4~6℃ 下贮存备用, 酶标半抗原于 -20℃ 贮存 24 h, 取出 1 号酶标半抗原置于室温下 0.5 h 后, 重新于 -20℃ 存放 1 h, 再取出 1 号和 2 号酶标半抗原置于室温下 0.5 h, 再重新于 -20℃ 存放 1 h 重复上述过程, 每次增加 1 个酶标半抗原, 直至取到 8 号后, 在酶标半抗原优化浓度条件下分别测定酶标板的 OD 值 [每个编号的酶标半抗原用一条 (8 孔) 板], 设未经冻融的酶标半抗原为对照, 检查 OD 值发生明显变化时的冻融次数。

1.9.3.2 包被酶标板 将新制的酶标半抗原和包被上抗体(以优化工作浓度包被)并经稳定剂处理的酶标板(可拆卸式,逐条编号,1~12号)密封包装,酶标板于-20℃存放24h,酶标半抗原于4~6℃贮存备用。包被好的酶标板按1.9.3.1节方法逐条取出,反复冻融,用未经冻融的酶标半抗原分别测定OD值,设未经冻融的酶标板为对照,检查OD值发生明显变化时的冻融次数。

1.9.4 对其他农药抗体的稳定效果 用1.8.3节中筛选出的优化稳定剂按1.9.1节方法处理包被上抗克百威单克隆抗体^[15]的酶标板,以考查筛选出的稳定剂对其他抗体是否也具有较好的稳定作用。

2 结果与分析

2.1 抗体-酶标半抗原工作浓度

经方阵试验测定、筛选得到的最适工作浓度分别为抗体 11.5 μg/mL、酶标半抗原 0.0125 μg/mL。

表 1 不同稳定剂的组成

Table 1 The composition of different stabilizers

成分 Components	质量分数 Amount(m fn, %)		
	1	2	3
甘油 Glycerol	2.5	1.0	3.5
山梨醇 Sorbitol	/	1.2	1.5
氨基酸 Amino acid	1.5	0.5	1.0
多肽 Peptide	/	2.0	2.5
蛋白胍 Peptone	3.0	1.2	2.5
离子螯合剂 Chelator	0.1	0.2	/
防腐剂 Antiseptic agent	0.01	0.01	0.01

2.4 不同稳定剂对包被抗体活性的影响

用选出的3组稳定剂分别处理3块包被抗体的酶标板,用直接ELISA法检测抗体免疫活性,其平均OD值见表2。数据通过DPS统计软件处理表明:稳定剂1和3处理组与对照组在1%水平上无显著性差异;稳定剂2处理组比对照组抗体活性轻微降低,两组在1%水平上差异显著;对照组与对照组及稳定剂1、2、3处理组相比,OD值明显降低,包被抗体未经稳定剂处理,25℃放置7d后,抗体几乎完全失去活性。总体而言,几组稳定剂对抗体活性的保持均有帮助,稳定剂2的效果不如1和3,未经稳定剂处理的抗体低温保存有利于活性的保持,常温保存抗体活性很快丧失。

2.2 抗体亲合性及检测灵敏度

包被抗体未经稳定剂处理的酶标板,三唑磷对抗体抗原反应的抑制率呈明显的S形曲线(图2)。在1.95~1000 ng/mL浓度范围内,抑制率与浓度呈线性关系,线性回归方程为 $I = 13.537 \ln(c) - 5.6173$, $R^2 = 0.9918$ 检测灵敏度 $I_{0.05}$ 为 3.17 ng/mL。

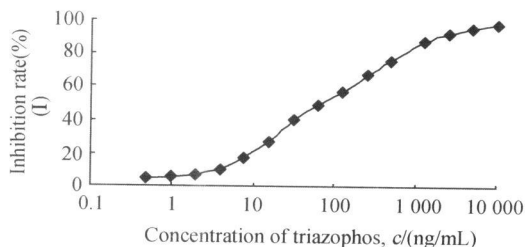


图 2 三唑磷 ELISA 抑制反应曲线

Fig 2 Inhibition reaction curve for triazophos ELISA

2.3 稳定剂的组成

按照经验法和正交法相结合的手段配制出3组稳定剂,其组成见表1。

从OD值的结果筛选出稳定剂1和3,进一步考查其对标准曲线及抗体亲和性、检测灵敏度等的影响,结果见图3(数据表示5次平行测定的平均值)。由图可知,稳定剂1处理组的抑制反应曲线与对照组的重合度较好,对抗体的亲和性和检测灵敏度影响较小(CK: $I_{50} = 60.86$ ng/mL, $I_{10} = 3.17$ ng/mL; 稳定剂1处理组: $I_{50} = 60.47$ ng/mL, $I_{10} = 2.95$ ng/mL; 线性范围均为1.95~1000 ng/mL); 稳定剂3处理组的抑制反应曲线与对照组的偏离较大,抗体的亲和性和检测灵敏度发生了明显变化(稳定剂3处理组: $I_{50} = 136.11$ ng/mL, $I_{10} = 9.65$ ng/mL),且线性范围发生了改变(7.8~1000 ng/mL)。因此最终选择了稳定剂1。

表 2 不同稳定剂处理的包被板 37℃下放置 7 d后的 OD 值

Table 2 The OD value of the coated PAbs treated with different stabilizers by direct competitive ELISA format (stored at 37°C for one week)

编号 No	OD 值* OD value				
	CK ₁ ()**	CK ₂ ()***	稳定剂 Stabilizer		
			1	2	3
1	1.375	0.413	1.305	1.278	1.378
2	1.352	0.422	1.321	1.256	1.415
3	1.363	0.401	1.310	1.243	1.405
1% 显著性 1% Significant	A	C	A	B	A

* 数据表示 12 次平行测定的平均值; ** CK₁ 为包被抗体未经稳定剂处理, 4~6℃放置 7 d *** CK₂ 为包被抗体未经稳定剂处理, 25℃放置 7 d * Data represent the means of 12 experiments ** CK₁ indicates the coated Ab was treated without any stabilizer but stored at 4~6°C for 7 d *** CK₂ indicates the coated Ab was treated without any stabilizer but stored at 25°C for 7 d

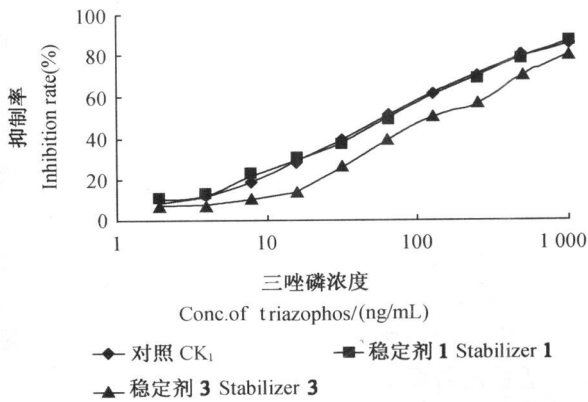


图 3 不同稳定剂对抑制反应曲线的影响

Fig 3 Effects of different stabilizers on inhibition reaction curves of triazophos ELISA

注: CK 为包被抗体未经稳定剂处理, 4~6℃放置 7 d

Note: CK means the coated antibody was treated without any stabilizer and stored at 4~6°C for 7 d

表 3 包被抗体经稳定剂 1 处理及未经处理后 37℃放置不同时间的 OD 值、I₅₀ 和 I₁₀Table 3 The average OD value, I₅₀ and I₁₀ of the coated PAbs treated with or without stabilizer 1 by direct competitive ELISA format (stored at 37°C for different time)

处理 Treatment		时间 Time/d									
		0	1	2	3	4	6	8	10	12	14
稳定剂 1 Stabilizer 1	OD	1.378	1.355	1.336	1.343	1.337	1.343	1.321	1.339	1.329	1.298
	I ₅₀ /(ng/mL)	60.73	/	/	/	/	/	/	/	/	54.38
	I ₁₀ /(ng/mL)	3.11	/	/	/	/	/	/	/	/	3.22
对照 CK	OD	1.372	0.729	0.543	0.397						
	I ₅₀ /(ng/mL)	60.86	/	/	×						
	I ₁₀ /(ng/mL)	3.17	/	/	×						

注: 表中数据为 8 次平行测定的平均值 (n = 8); “/”表示未测; “×”表示无法测定。下同。

Note: Data in table 3 represent the means of eight experiments “/” indicates “no detection”, “×” indicates “datum could not be detected”.

The same as in table 4.

度变化很小 (I_{50} 和 I_{10} 分别为: 68.43和 3.72 ng/mL; 线性范围 1.95~1 000 ng/mL); 未经稳定剂处理的包被抗体, 抑制反应标准曲线已经无法建立。

2.7 冻-融试验

结果见图 4。从结果可知, 三唑磷酶标半抗原在 8 次冻融次数内, OD 值略有波动, 但未见明显降低趋势, 表明在实验设定的冻融次数内三唑磷酶标半抗原活性基本不变; 包被在酶标板上的抗三唑磷抗体在 8 次冻融次数内, OD 值基本不变, 当冻融次数再增加时, OD 值有轻微下降的趋势, 表明三唑磷抗体活性在冻融 8 次内是稳定的, 但继续冻融会导致抗体逐渐失活。

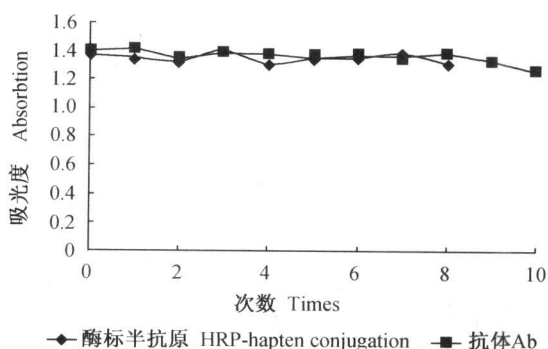


图 4 三唑磷试剂盒冻融试验 ($n = 8$)

Fig 4 Freeze-thaw test for triazophos ELISA kit ($n = 8$)

2.8 稳定剂对克百威单克隆抗体稳定性的影响

试验结果见表 4。从中可知, 酶标板上包被的克百威单克隆抗体经稳定剂处理、加速贮存试验 14 d 后, 仍然保持了较高的活性 (OD_{0d} 1.283, OD_{14d} 1.107; 活性相对保持率为 86.3%), 且对抗体的亲和性和检测灵敏度影响很小; 而未经稳定剂处理的克百威单克隆抗体在加速贮存试验 3 d 后, 已完全不能用于 ELISA 检测 (OD_{3d} 0.228)。

表 4 稳定剂对克百威单克隆抗体稳定效果 ($n = 8$)

Table 4 Effects of the selected stabilizer on carbofuran monoclonal antibody ($n = 8$)

处理 Treat ment	OD 值 OD value								I_{50} / (ng/mL)		I_{10} / (ng/mL)	
	0 d	1 d	3 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	0 d	14 d	0 d	14 d
处理组 Treat ment	1.283	1.269	1.256	1.248	1.244	1.158	1.113	1.107	14.97	16.33	1.05	1.57
CK	1.274	0.692	0.228	/	/	/	/	/	14.83	×	0.97	×

注: 数据由直接竞争 ELISA 包被抗体模式测定得到。Note: Data by direct competitive ELISA (antibody coated format).

3 讨论

3.1 稳定剂的组成与配制

抗体本质上是由氨基酸残基组成的活性蛋白, 其与抗原的相互作用是通过空间结构互补而非共价键结合实现的^[16]。因此, ELISA 中包被抗体稳定剂研究的关键主要是使吸附在酶标板上的抗体蛋白空间结构保持稳定, 从而达到保持抗体活性的目的。影响抗体活性的因素主要有溶液的 pH 值、盐分和糖分的浓度、微生物的作用、空气的氧化等。氨基酸是很好的抗氧化剂; 各种糖能起到保护抗体分子活性的作用; 离子螯合剂有多种功效, 如抗氧化、防腐, 亦可防止一些离子沉积; 甘油、山梨醇则有利于保持抗体表面的湿润, 使抗体不致因失水而失活。另外, 一些水溶性杂蛋白或化学惰性高分子物质的聚合物 (PEG 等) 因相对分子质量大, 能够在包被于酶标板上的抗体表面形成一层保护膜, 使抗体蛋白处于塑料板与保护膜的夹层之中, 从而保护蛋白结构免遭破坏。另一方面, 随着保存时间的延长, 酶标板上的抗体及稳定剂中的氨基酸、糖类有机物有可能受到空气、水分中微生物的腐蚀, 使保护作用下降, 因此也需加入适量的防腐剂。

本研究选择了多种试剂用作三唑磷多克隆包被抗体稳定剂配方筛选。为减少工作量, 采用经验法和正交法相结合的手段来确定稳定剂的配方。例如根据经验确定柳硫汞 (质量分数为 0.01%) 为杀菌剂, 以 EDTA 二钠为离子螯合剂 (质量分数不超过 0.2%) 等, 其他组份设置成不同的浓度, 通过正交实验比较、分析, 筛选出几组对抗体活性影响较小的配方, 再从中筛选出对抗体活性、抗体的亲和性 (I_{50})、检测灵敏度 (I_{10}) 及标准曲线线性范围影响均较小的稳定剂配方。用筛选出的稳定剂处理包被抗体, 经冷藏试验 (4~6°C, 半年)、加速贮存试验 (37°C, 14 d) 及冻-融试

验, 结果表明, 抗体的免疫活性、亲合性、检测灵敏度等没有显著变化, 基本满足商品化三唑磷 ELISA 试剂盒货架期的要求。

3.2 稳定剂对其他农药抗体的稳定作用

筛选出的稳定剂对克百威单克隆抗体也有较好的稳定作用。但对于其他农药的抗体, 其组成、结构、性质等方面会存在一定差异, 因此, 该稳定剂的稳定效果还有待于进一步研究。

3.3 稳定期评价方法的有效性

试剂盒在生产、运输和使用过程中会存在低温-常温反复冻-融过程, 从低温到常温这一过程会对抗体等蛋白分子产生剪应力从而破坏蛋白的活性。本研究采用 -20℃和 25℃反复交替存放的形式模拟了这一过程。试验结果表明, 冻-融次数不超过 8 次时, 抗体活性能够保持, 因此建议在实际生产应用中, 试剂盒冻-融次数不宜过多, 以保存在 4~6℃条件下为宜。

由于国内尚未有农药试剂盒的生产报道, 且未见有农药试剂盒相关的生产标准, 故本研究中的加速贮存试验及冻融试验等方法对试剂盒货架期评价的有效性有待于进一步验证。

参考文献:

- [1] XIE Guang-dong (谢光东). 8% 三唑磷微乳剂的研制及田间药效试验 [J]. Pesticide (农药), 2002, 41: 19-20
- [2] WANG Zhen-rong (王振荣), LIBU-qing (李步清). Gather of Pesticides and Foods Second Edition (农药食品大全, 第二版) [M]. Beijing (北京): China Commercial Publishing House (中国商业出版社), 1998: 72-73.
- [3] YANG Yong-zhen (杨永珍), SONG Jun-hua (宋俊华), WU Hou-bin (吴厚斌), et al. 欧盟农药管理措施对我国的影响及对策 [J]. Pesticide Science and Administration (农药科学与管理), 2004, 25: 32-37.
- [4] ZHONG Zhi (钟志), LIU Qin (刘琴), GU Pei-qiao (顾蓓乔), et al. 气相色谱法测定水产品中三唑磷农药残留量 [J]. J Zhejiang Ocean Univ: Nat Sci Ed (浙江海洋学院学报: 自然科学版), 2006, 25: 196-199.
- [5] YANG Ji-feng (杨基峰), HE Jin-ming (贺进明), HE Xu-yuan (何旭元), et al. 蔬菜中三唑磷农药残留的清除研究 [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2006: 163-164.
- [6] PAN Dan-dan (潘丹丹), HE Xiao-dong (何晓东). 三唑磷在水中残留分析方法的研究 [J]. Pesticide Science and Administration (农药科学与管理), 2006, 27: 13-15
- [7] XUE Chao-bo (薛超波), LIU Hui-hui (刘慧慧), WANG Guo-liang (王国良), et al. 海洋滩涂沉积物环境中三唑磷残留的 GC/MS 检测 [J]. Chin J Health Lab Tech (中国卫生检验杂志), 2006, 16: 522-523, 618.
- [8] DAI Qing-hua (戴清华), ZHANG Rui-fu (张瑞福), JIANG Jian-dong (蒋建东), et al. 一株三唑磷降解菌 mp-4 的分离鉴定及降解特性的研究 [J]. Acta Pedologica Sinica (土壤学报), 2005, 42: 111-115.
- [9] WEI Lin-hong (韦林洪), WANG-Lian (王莲), LIU Shu-zhao (刘曙照). 稻米中三唑磷残留免疫亲和色谱-高效液相色谱分析 [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 2006, 39: 941-946
- [10] PARK JW, KUROSAWA S, IZAWA H, et al. Comparison of Stabilizing Effect of Stabilizers for Immobilized Antibodies on QCM Immunosensors [J]. Sensors and Actuators B, 2003, 91: 158-162.
- [11] ENGVALL E, PERLMANN P. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Quantitative Assay of Immunoglobulin G [J]. Immunochimistry, 1971, 8: 871-873.
- [12] LUENG W, CHAN P, BOSGOED E, et al. One-step Quantitative Cortisol Dipstick with Proportional Reading [J]. J Immunol Methods, 2003, 281: 109-118.
- [13] GUI W J, JIN R Y, CHEN Z L, et al. Hapten Synthesis for Enzyme-linked Immunosorbent Assay of the Insecticide Triazophos [J]. Anal Biochem, 2006, 357: 9-14.
- [14] GUI Wen-jun (桂文君), JIN Ren-yao (金仁耀), HUANG Ya-li (黄雅丽), et al. 毒死蜱多克隆抗体的制备 [J]. Chin J Pestic Sci (农药学报), 2006, 8(2): 109-114.
- [15] JIN Ren-yao (金仁耀), WU Jian-xiang (吴建祥), ZHU Guo-nian (朱国念), et al. 抗克百威单克隆抗体的研制 [J]. J Agro-Environ Sci (农业环境科学学报), 2006, 25(5): 1276-1280
- [16] ROITTM, ROITTD J. Roitt's Essential Immunology (免疫学基础, 第 10 版) [M]. Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 2005: 77-78

(Ed JIN SH)