

文章编号:1000-8551(2013)04-0515-09

基于双特异性单克隆抗体的克百威和三唑磷多残留 ELISA 分析方法研究及在环境样品中应用

金仁耀¹ 朱国念²

(¹浙江工商大学食品与生物工程学院,浙江 杭州 310012; ²浙江大学农药与环境毒理研究所,浙江 杭州 310029)

摘要:采用杂交-杂交瘤技术制备抗克百威和三唑磷的双特异性单克隆抗体并进行纯化,通过对反应模式、工作浓度、包被缓冲液、有机溶剂、离子强度、pH 值等条件优选,建立优化的 ELISA 分析方法,对克百威和三唑磷的线性回归方程分别为 $Y = 20.009 \ln(x) - 9.9293$ ($R^2 = 0.9959$) 和 $Y = 19.486 \ln(x) + 39.752$ ($R^2 = 0.9945$), 抑制中浓度 I_{50} 分别为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 最低检测限 I_{20} 分别为 $4.46 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。建立的 ELISA 分析方法对水、土壤等环境样品中克百威和三唑磷的平均添加回收率介于 88.4% ~ 117% 之间,说明所制备的双特异性单克隆抗体和建立的 ELISA 分析方法可靠,可应用于克百威和三唑磷的多残留免疫分析。

关键词:双特异性单克隆抗体;克百威;三唑磷;多残留检测;ELISA

Development of a Multi-Residue Enzyme-Linked Immunoassay Based on Bispecific Monoclonal Antibody for Carbofuran and Triazophos and Its Environmental Application

JIN Ren-yao¹ ZHU Guo-nian²

(¹ College of Food Science Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310035;

² Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029)

Abstract: The bispecific monoclonal antibody to N-methylcarbamate pesticide carbofuran and Organophosphorus pesticide triazophos was produced by hybridoma (tetradoma) technology. After purifying the antibody, the optimized ELISA condition, like reaction format, working concentration, coating buffer solution, organic solvent, phosphate ion strength and pH value were investigated. The developed immunoassay showed that the linear recursive equation followed $Y = 20.009 \ln(x) - 9.9293$ ($R^2 = 0.9959$) and $Y = 19.486 \ln(x) + 39.752$ ($R^2 = 0.9945$) for carbofuran and triazophos, respectively. Inhibition rate analysis showed that I_{50} and I_{20} values were $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4.46 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.36 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for carbofuran and triazophos, respectively. The mean recovery of carbofuran and triazophos in environmental samples such as water and soils were 88.4% and 117%, respectively. The result showed that the developed immunoassay based on bispecific monoclonal antibody was reliable and useful for multi-residue assay for pesticide carbofuran and triazophos.

Key words: Bispecific monoclonal antibody; Carbofuran; Triazophos; Multi-residue; ELISA

收稿日期:2012-08-16 接受日期:2013-01-16

作者简介:金仁耀(1981-),男,浙江遂昌人,博士、助理研究员,主要从事免疫化学分析和食品安全检测领域的研究。Tel: 0571-88071024-7587;

Email: nodjin@163.com

农药残留的危害性目前已经被人们广泛认识,其违禁使用和超量滥用而引起的食品安全问题时有发生,如何提高其监管效率、完善监管体系、提升检测技术水平是保障食品质量安全的最后环节^[1]。由于目前农药品种繁多,多残留现象严峻,开展多残留检测技术研究,尤其是实现快速、高通量、能现场操作等检测技术显得尤为迫切,而免疫分析方法^[2]正是具备这些特点被应用与农药多残留检测分析。目前采用免疫分析方法进行农药多残留检测通常有两种方法,一种是采用一类药物的共有结构作为免疫半抗原,获得对同类农药具有特异性识别反应的广谱抗体,如 Alococer 等^[3]用有机磷的通用结构磷酸作为半抗原,成功制备了广谱性的多克隆抗体,且对 10 种以上的有机磷农药有特异性识别;骆爱兰等^[4]用拟除虫菊酯类农药的共有结构间苯氧基苯甲酸(PBA)为半抗原,也成功制备了广谱性的多克隆抗体,并对 5 种菊酯有特异性识别。另一种是采用将多个农药的半抗原偶联到载体蛋白上制备成人工抗原,经过动物免疫获得对目标农药有特异性识别的“宽谱”抗体,如 Wang 等^[5]通过对人工抗原的设计,将克百威、三唑磷、毒死蜱和甲基对硫磷半抗原偶联到一个载体蛋白分子上,制备出了多抗原决定簇的人工抗原并获得了能同时识别上述 4 种农药的“宽谱特异性”多克隆抗体,达到多残留检测的目的。

抗体在农药多残留免疫分析中的作用非常关键,已报道的多残留免疫分析的抗体多为多克隆抗体,由于多克隆抗体会随着动物种类及个体差异而有变化,生产数量有限及可重复性差,在应用中会受到一定的限制,随着单克隆抗体技术的出现^[6],解决了抗体制备过程中抗体性状不稳定的问题。特别是基于杂交-杂交瘤技术的双特异性单克隆抗体技术的建立^[7-8]和应用^[9-11],为多残留免疫分析技术提供了新的思路,该技术从抗体的结构和特性上入手,区别于传统的多残留免疫分析技术在半抗原和人工抗原的结构上进行一系列的改造,通过杂交-杂交瘤技术获得能特异性识别两种小分子化合物甚至是两类小分子化合物的双特异性单克隆抗体,为小分子化合物多残留检测技术的发展开辟新的研究思路和发展方向。

本论文以克百威和三唑磷为研究对象,在前期研制抗克百威和三唑磷双特异性单克隆抗体的基础上^[12],以包被抗体、酶标半抗原(THHe-HRP, BFNB-HRP)和样品中的半抗原竞争反应模式,建立检测克百威和三唑磷的 ELISA 方法,为双特异性单克隆抗体在兽药快速检测中的应用前景提供重要技术依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂耗材 双特异性单克隆抗体、克百威、三唑磷酶标半抗原由本实验室自制;99.8%克百威标准品由浙江省疾病预防控制中心提供;三唑磷(99.5%)标准品由浙江省农药检定所提供;辣根过氧化物酶(HRP)为 AMRESKO 产品;美国 CORNING96 孔酶标板(货号 9018);土壤样品和水样品取自浙江杭州;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 上海嘉鹏科技有限公司 RE-52 AAA 型旋转蒸发器;上海欣茂仪器公司 UV 7504pc 型分光光度计;SIEMENS 公司低温冰箱;太仓市科教器材厂 WH-861 漩涡震荡器;Sartorius 公司电子天平;Bio-Rad 680 酶标仪;美国 MD 公司 Max2000 型洗板机;江苏康泰医疗器材厂 MM-1 型微量振荡器。

1.2 试验方法

1.2.1 双特异性单克隆抗体的制备和纯化 双特异性单克隆抗体的制备方法按照 Jin 等^[12]的方法进行。克百威、三唑磷半抗原和人工抗原的合成分别按照朱国念等^[13]和 Gui 等^[14]的方法进行,制备的人工抗原免疫小鼠后取脾脏细胞与 SP2/0 细胞融合,然后通过检测、筛选能分泌克百威单克隆抗体和分泌三唑磷单克隆抗体的杂交瘤细胞株,在此基础上,采用诱导法,使杂交瘤细胞的 HGPRT 酶或 TK 酶缺失,然后采用杂交-杂交瘤技术融合筛选获得抗克百威和三唑磷的四体杂交瘤细胞株,并通过注射 BALB/C 小鼠进行腹水制备。制备的腹水采用辛酸-硫酸铵法纯化^[15],用紫外分光光度计分别测定纯化抗体的紫外 260 nm 和 280 nm 的光密度,用 Lowry-kalokar 公式计算蛋白质的浓度,其余纯化的单抗-70℃保存备用。

1.2.2 包被温度和时间选择 在一定温度(0~43℃)和时间(0~48 h)范围内,包被效果随着时间的延长和温度的升高而增加,然而由于高温尤其是长时间高温易引起蛋白质变性,包被时间过长、温度过高都不利于包被。因此本试验选择在 4℃包被过夜(12 h);37℃包被 1 h、2 h、3 h 和 43℃包被 1 h、2 h、3 h 等几种模式,通过测定 OD_{490nm} 值以确定最佳包被温度和时间。

1.2.3 包被缓冲液选择 本实验选用 0.05 mol·L⁻¹ pH 9.6 CBS、0.1 mol·L⁻¹ pH 9.6 CBS、0.2 mol·L⁻¹ pH 9.6 CBS、生理盐水、pH 7.0 PBS、pH 7.4 PBS、pH 8.0 PBS、pH 5.5 柠檬酸-Na₂HPO₄、蒸馏水稀释包被抗原等几种模式进行包被,通过测定 OD_{490nm} 值以选择包被

缓冲液。

1.2.4 最佳工作浓度选择 将抗体用最佳包被液稀释成一系列浓度,分别依次加入 96 孔酶标板(100 μ L/well),最佳包被温度和包被时间下进行包被后 PBST 洗涤 3 次;加 2% 脱脂牛奶每孔 300 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 h, PBST 洗涤 3 次;加入预先以封闭液稀释成不同浓度的酶标半抗原(100 μ L/well),37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次;加入底物溶液(100 μ L/well),37 $^{\circ}$ C 温育 15min,加入终止液(50 μ L/well),用酶标仪测定 OD_{490nm} 值,以 OD_{490 nm} 值约为 1.0,抗体-酶标半抗原用量较少的浓度组合为抗体-抗原的工作浓度。

1.2.5 有机溶剂选择 在最佳工作浓度下,农药标样缓冲液中加入一定含量的甲醇、丙酮、乙腈(含量为 5、10、20、40%,与酶标抗原混合后有机溶剂最终含量为 2.5、5、10、20%),通过测定不同溶剂不同浓度下对抗原抗体结合反应的影响,选择影响最小的溶剂和浓度作为 ELISA 反应条件。

1.2.6 离子强度选择 用含不同离子浓度的 PBS 缓冲液(0.01 mol \cdot L⁻¹, 0.02 mol \cdot L⁻¹, 0.05 mol \cdot L⁻¹ 和 0.1 mol \cdot L⁻¹)配置标样,考察不同离子浓度下对抗原抗体结合反应的影响,选择影响最小的离子浓度作为 ELISA 反应条件。

1.2.7 pH 值选择 用含不同 pH 值强度的 PBS 缓冲液(pH 值为 6.0,6.5,7.0,7.4,8.0 和 8.5)配置标样,考察不同 pH 值对抗原抗体结合反应的影响,选择影响最小的 pH 值作为 ELISA 反应条件。

1.2.8 样品添加回收率实验 样品前处理方法为水样:吸取 10mL 预先过滤或离心的水样品,准确添加以甲醇配制的农药标液 0.1mL,混匀,直接用于 ELISA 检测。土壤样品:将土壤样品风干,过 60 目试验筛,称取 2 g 样品,以 2mL 乙腈震荡提取 1min,离心(4 000 r \cdot min⁻¹, 5min),吸取 1mL 上清液,氮气吹干,加入一定量的 PBS(优化条件下的缓冲液),旋涡震荡 1min,用于 ELISA 检测。

2 结果与分析

2.1 双特异性单克隆抗体的制备和纯化

融合的四体杂交瘤细胞经培养 10d,同时用克百威人工抗原和三唑磷人工抗原检测细胞培养上清,经阳性测定和灵敏度测定,获得一株四体杂交瘤细胞 12C1,后经多次克隆后,细胞悬液注射小鼠腹腔制备腹水,1 周后抽取腹水。经测定,腹水对克百威和三唑磷的效价均在 1×10^{-6} 以上,以 P/N > 2.1 为单克隆抗

体最大稀释度。腹水采用辛酸-硫酸铵纯化后冻干并保存于 -70 $^{\circ}$ C。

2.2 包被温度和时间

不同包被温度和时间的影响结果见表 1。由表中可知,包被 1 h 情况下,37 $^{\circ}$ C 与 43 $^{\circ}$ C 的包被效果没有明显差别,当包被时间超过 1 h 情况下,37 $^{\circ}$ C 包被效果比 43 $^{\circ}$ C 包被效果要好,说明当包被温度过高,一方面可能会产生高吸附速率和高解吸速率,另一方面可能是影响抗体或包被抗原的性状的稳定性,导致包被效果的下降。4 $^{\circ}$ C 包被 12 h 条件下的包被效果与 37 $^{\circ}$ C 包被 2 h 条件下的效果没有明显差别,但是 4 $^{\circ}$ C 包被所需时间相对更长,因此,选择 37 $^{\circ}$ C 包被 2 h 条件作为最佳包被条件。

表 1 不同包被温度、时间的包被效果

Table 1 OD_{490nm} values under different coating temperature and time

温度 Temperature	时间 Time	OD _{490nm}
4 $^{\circ}$ C	12 h	1.374
37 $^{\circ}$ C	1 h	1.112
	2 h	1.475
	3 h	1.483
43 $^{\circ}$ C	1 h	1.096
	2 h	1.363
	3 h	1.371

2.3 包被缓冲液

不同缓冲液包被效果见表 2。由表中可知,用蒸馏水包被的酶标板效果最差,说明一定的离子浓度有利于蛋白质分子在载体表面的吸附。在 CBS 缓冲体系中,随着 CBS 离子浓度的增加,OD_{490nm} 值降低,包被效果下降;在 PBS 缓冲体系中,pH 在 8.0 时包被效果比 pH 在 7.4 和 7.0 时要好,但在相同 pH 值条件下,离子浓度的变化影响不是很明显,因此,选择 0.05 mol \cdot L⁻¹ pH 8.0 的 PBS 作为抗体包被缓冲液。

2.4 工作浓度确定

采用方阵试验法测定抗体和酶标半抗原的稀释度,三唑磷采用异源分析,酶标半抗原为 THHe-HRP,克百威酶标半抗原为 BFNB-HRP,通过测定,OD_{490nm} 值在 1.0 左右,灵敏度最高的浓度组合为 BisMcAb、THHe-HRP 的浓度分别为 4 μ g \cdot mL⁻¹ 和 15.6 ng \cdot mL⁻¹; BisMcAb, BFNB-HRP 的浓度分别为 1 μ g \cdot mL⁻¹ 和 15.6 ng \cdot mL⁻¹,以此组合作为最优工作浓度。

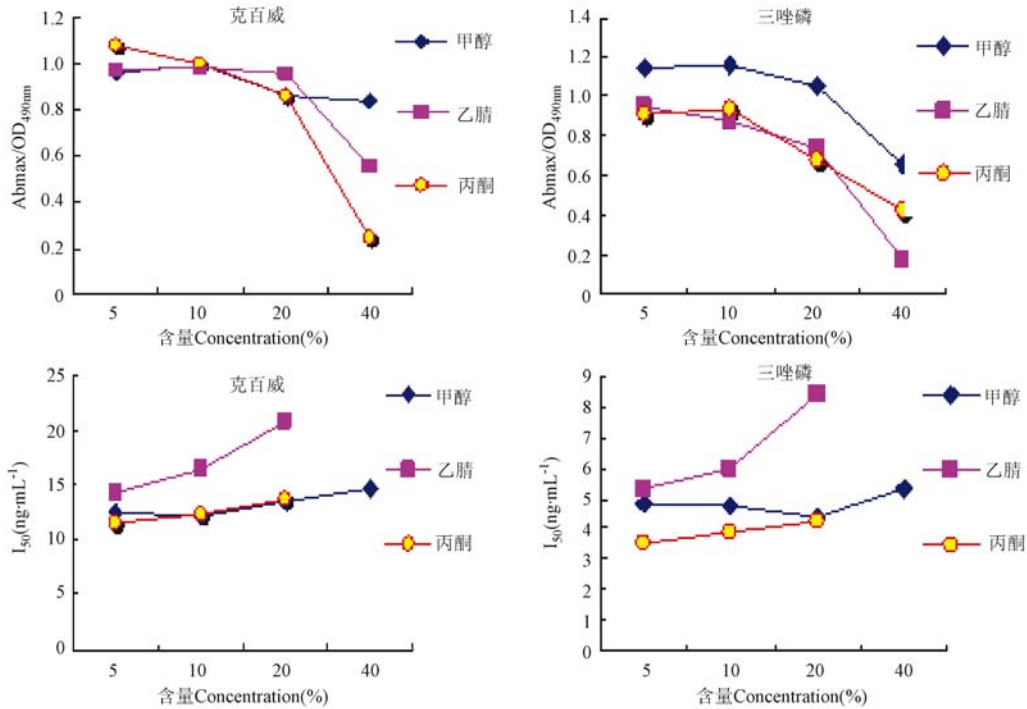


图 1 有机溶剂对克百威(左)和三唑磷(右)ELISA 的影响

Fig.1 The effect of organic solvent on Carbofuran (left) and Triazophos (right) ELISA

表 2 不同缓冲液的包被效果比较

Table 2 Comparison of coating effect with different coating buffers

缓冲液 Buffer	pH 值 pH Value	离子强度 Phosphate ion (mol·L ⁻¹)	OD _{490nm}
CBS	9.6	0.05	1.324
		0.10	1.256
		0.20	1.187
PBS	7.0	0.01	1.223
		0.05	1.226
		0.01	1.285
		0.05	1.312
		0.01	1.356
柠檬酸 - Na ₂ HPO ₄ Citric acid buffer	5.5	0.05	1.503
		0.05	1.256
生理盐水 Salina	7.0	0.15	1.315
蒸馏水 Distilled water	7.0	0	0.334

2.5 有机溶剂

有机溶剂的影响见图 1。由图可知,各种有机溶剂含量高时对 ELISA 反应均有非常明显的抑制作用。

对克百威的影响,随着有机溶剂含量的增加,吸光值 (Abmax) 逐渐降低,而 I₅₀ 值则逐渐升高;特别是在高浓度情况下,变化趋势更大,其中在含 40% 丙酮和乙醇的情况下连标准曲线都无法建立,在低浓度情况下 Abmax 和 I₅₀ 变化不大,其中丙酮的 Abmax 比甲醇和乙醇高,而 I₅₀ 比甲醇和乙醇要低;对三唑磷的影响,大趋势上随着有机溶剂含量的增加,Abmax 逐渐降低,而 I₅₀ 值则逐渐升高,其中 I₅₀ 值的变化波动范围比较大,丙酮含量在 5% 条件下的 I₅₀ 最小。综合考虑,克百威和三唑磷有机溶剂优化选为丙酮,含量均为 5%。

2.6 离子强度

离子强度影响见图 2。由图可知,对克百威的影响,随着离子浓度的增加,Abmax 没有明显的变化。而 I₅₀ 值则逐渐降低,在 0.1 mol·L⁻¹ 浓度达到最低值。因此,选择 0.1 mol·L⁻¹ 离子浓度的 PBS 作为最优的缓冲液;对三唑磷的影响,随着离子浓度的增加,Abmax 也没有明显变化,而 I₅₀ 值变化则先降低,后逐渐升高,在 0.05 mol·L⁻¹ 时达到最低点,因此,选择 0.05 mol·L⁻¹ 离子浓度的 PBS 作为最优的缓冲液。

2.7 pH 值

pH 值影响结果见图 3。由图可知,随着 pH 值的

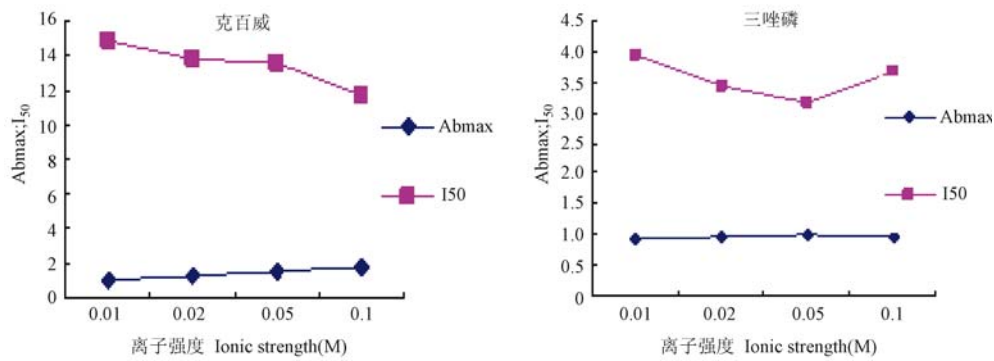


图 2 离子浓度对克百威(左)和三唑磷(右)ELISA 的影响

Fig. 2 The effect of Ionic Strength on Carbofuran (left) and Triazophos (right) ELISA

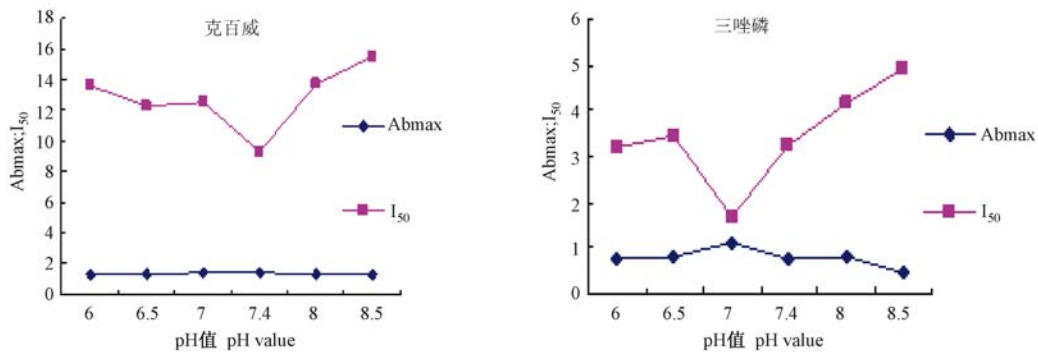


图 3 pH 对克百威(左)和三唑磷(右)ELISA 的影响

Fig. 3 The effect of pH on Carbofuran (left) and Triazophos (right) ELISA

变化, Abmax 没有明显的波动变化, 而 I_{50} 值的波动则较大, 随着 pH 值的升高, 克百威和三唑磷的 I_{50} 值均出现先下降后回升的现象, 其中克百威在 pH 值为 7.4 时 I_{50} 值达到最低点, 三唑磷在 pH 值为 7.0 时 I_{50} 值达到最低点, 因此选择 pH 7.0 和 7.4 作为三唑磷和克百威的最优 pH 值。

2.8 优化条件汇总

通过对包被体系、最佳工作浓度、有机溶剂、离子浓度和 pH 值的条件筛选, 最优化的 ELISA 条件汇总表 3。

在优化的 ELISA 分析条件下, 对克百威和三唑磷分别建立标准曲线, 以考察其在最优化的反应体系中的检测灵敏度, 结果见图 4。由图可知, 克百威 ELISA 反应标准曲线线性回归方程为 $Y = 20.009 \ln(x) - 9.9293$, $R^2 = 0.9959$, I_{50} 为 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, I_{10} 为 $2.70 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围 $4.46 \sim 89.52 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 三唑磷 ELISA 反应标准曲线线性回归方程为 $Y = 19.486 \ln(x) + 39.752$, $R^2 = 0.9945$, I_{50} 为 $1.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, I_{10} 为 $0.22 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围 $0.36 \sim 7.89 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

变化, Abmax 没有明显的波动变化, 而 I_{50} 值的波动则较大, 随着 pH 值的升高, 克百威和三唑磷的 I_{50} 值均出现先下降后回升的现象, 其中克百威在 pH 值为 7.4 时 I_{50} 值达到最低点, 三唑磷在 pH 值为 7.0 时 I_{50} 值达到最低点, 因此选择 pH 7.0 和 7.4 作为三唑磷和克百威的最优 pH 值。

2.9 样品分析

根据建立的分析方法, 进行添加回收率试验, 结果见表 4。克百威添加回收率情况如下: 克百威水样的添加浓度为 5、10 和 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个梯度, 从试验结果来看, 水样的平均回收率在 101.4% ~ 117.0% 范围内波动, 其中自来水的波动最大, 在 63% ~ 146% 的大跨度区间范围内, 自来水的回收率结果的变异系数大, 达到 20% 以上, 其他水样的回收率变化范围相对要窄, 在 78% ~ 142% 之间, 且变异系数的变化范围在 11.6% ~ 16.1% 之间, 说明测定结果比较稳定, 方法可行性高; 土壤样品的添加浓度为 10 和 $20 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$, 回

表 3 ELISA 条件优化总结
Table 3 Summary of the ELISA Characteristics

包被抗体浓度 Antibody Coating concentration	三唑磷 Triazophos	克百威 Carbofuran
BisMcAb ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	4	1
[THHe-HRP] ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	156	naa
[BFNB-HRP] ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	naa	156
缓冲液条件 Buffer condition		
包被缓冲液 Coating Buffer	0.05 M PBS	0.05 M PBS
封闭液 - 脱脂牛奶(%) Blocking Buffer	2	2
有机溶剂(%) Solvent tolerance	5% Acetone	5% Acetone
离子浓度 Phosphate ion($\text{m mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	50	100
pH 值	7.0	7.4
标准曲线参数 Analytical characteristics of standard curve		
I_{50} ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.69	20.0
$I_{20} \sim I_{80}$	0.36 ~ 7.89	4.46 ~ 89.52
I_{10}	0.22	2.70
反应体系参数 Assay condition		
包被时间 Coating (h)	2	2
反应时间 Immunoreaction(h)	1	1
显色时间 Color development(min)	15	15

注:^a没有应用 Note: ^anot applicable

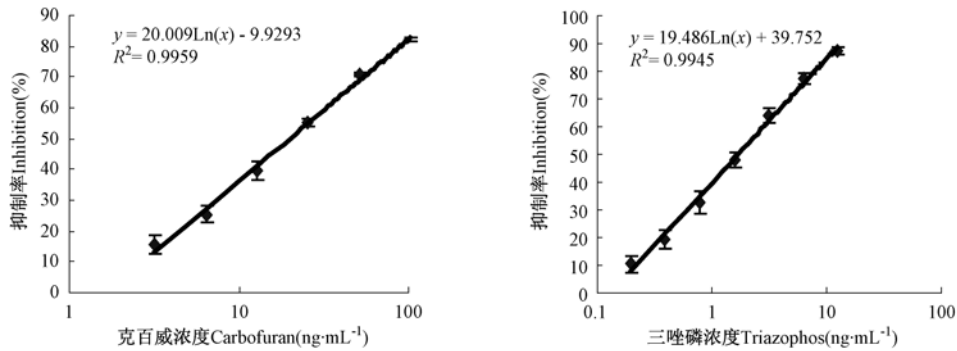


图 4 克百威(左)和三唑磷(右)ELISA 标准曲线

Fig. 4 ELISA standard curve for Carbofuran (left) and Triazophos (right)

收率平均值在 89.1% ~ 106.3% 之间,波动范围在 82% ~ 121% 之间,变异系数低,在 5.4% ~ 13.4% 之间,说明土壤样品检测结果稳定,方法可靠性高。

三唑磷添加回收率情况如下:三唑磷水样添加浓度为 0.5、1 和 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,回收率结果显示,平均回收率在 91.2% ~ 125.8% 范围内。其中自来水的波动范围最大,在 76% ~ 154% 之间,检测结果偏高,变异系

数高,在 15.3% ~ 36% 范围内,其余的水样的回收率在比较理想的范围内波动,74% ~ 134% 之间,而且变异系数相对自来水要低,说明对水样的检测方法可信度较好;对土壤样品,其平均回收率在 88.4% ~ 97.4% 范围内,变化波动范围在 76% ~ 108%,而且变异系数低,7.5% ~ 10.5% 之间,说明建立的方法能很好的检测土壤样品,建立的免疫分析方法可信。

表 4 克百威、三唑磷样品添加回收率分析

Table 4 Analysis by the optimized ELISA of samples spiked with carbofuran

样品 Sample	克百威 Carbofuran				样品 Sample	三唑磷 Triazophos			
	添加 浓度 Concentration (ng·mL ⁻¹)	回收率 Recovery (%)	变化 范围 Range	变异系数 CV(%)		添加 浓度 Concentration (ng·mL ⁻¹)	回收率 Recovery (%)	变化 范围 Range	变异 系数 CV(%)
自来水	5	101.4	63 ~ 136	21.6	自来水	0.5	91.2	76 ~ 138	26
Tap water	10	103.0	76 ~ 146	22.8	Tap water	1	121.9	90 ~ 154	17.8
	20	114.2	77 ~ 145	20.8		5	121.4	83 ~ 144	15.3
	5	117.0	93 ~ 142	16.1		0.5	105.8	82 ~ 125	15.2
池塘水	10	112.7	86 ~ 135	14.6	河水	1	106.5	80 ~ 134	17.5
	20	104.8	80 ~ 126	11.6		5	125.8	118 ~ 134	4.1
	5	105.6	78 ~ 123	15.4		0.5	96.1	75 ~ 128	17.5
河水	10	103.2	87 ~ 121	12.8	池塘水	1	101.0	74 ~ 124	15.8
	20	105.2	87 ~ 138	11.9		5	103.4	97 ~ 118	6.4
	10	96.6	92 ~ 102	5.2		1	88.4	76 ~ 99	9.3
黄红壤	20	89.1	82 ~ 96	5.4	Yellow-red soil	2	90.8	80 ~ 103	10.5
小粉土	10	106.3	93 ~ 116	9.5	小粉土	1	94.3	87 ~ 106	7.5
Silt-loamy paddy soil	20	104.8	86 ~ 121	13.4	Silt-loamy paddy soil	2	97.4	86 ~ 108	8.0
青紫泥	10	98.0	89 ~ 113	8.4	青紫泥	1	97.3	88 ~ 108	8.3
Purple clayed paddy soil	20	97.5	93 ~ 107	5.6	Purple clayed paddy soil	2	96.1	82 ~ 108	9.7

3 讨论

3.1 免疫分析技术是农兽药快速多残留检测技术发展的趋势

农药多残留酶免疫分析法的基本原理是根据待测物的共性结构或共有结构特征,设计并合成具有其通用结构特征的半抗原,偶联大分子蛋白后作为人工抗原并免疫动物,通过制备特异性抗体(或称宽谱特异性抗体、广谱特异性抗体),利用抗体建立酶免疫吸附测定(ELISA)、免疫胶体金(GICA)等免疫分析法。目前已有农药多残留免疫分析技术相关研究报道,如 Pullen 等^[16]、Mak 等^[17]、祝金凤等^[18]、杨挺等^[19]和李志茹等^[20]建立的针对拟除虫菊酯类农药的免疫多残留分析技术,Colin 等^[21]、Sudi 等^[22]、Banks 等^[23]、Jang 等^[24]、刘贤进等^[25]和 Liang 等^[26]等开展了有机磷农药的多残留免疫分析研究。另外,在氟啶酮类^[27-28]和磺胺类^[29-30]等兽药方面也有多残留免疫分析技术研究的报道,说明随着免疫分析技术的深入应用研究,已在农兽药多残留快速检测中发挥着越来越重要的作用,已逐渐成为农兽药多残留检测技术发展趋势。

抗体在免疫分析技术中的作用非常关键,目前报道的农兽药多残留免疫分析技术具有两个特点:一是从改造抗原结构入手,通过设计合成一类药物的通用结构来制备抗体,实现对一类药物的检测;二是所制备的抗体基本上以多克隆抗体为主。由于多克隆抗体批间差异性比较大,而且不能实现同性状抗体的大量生产,不利于后续的产业化开发,存在一定的局限性。根据抗体自身的特性,每个天然抗体分子具有两个完全一样的抗原结合位点,如何充分发挥其结合位点,扩大其识别种类,以便能应用于多残留检测分析,为探索农兽药多残留免疫分析提供新的思路。因此,通过改造抗体自身的结构来实现改变抗原结合位点的识别目标,已有通过使用化学交联的方法制备双特异性抗体的报道^[31],但由于该方法制备的抗体复合物形状不稳定,限制了其发展,而通过杂交-杂交瘤技术制备双特异性单克隆抗体则能很好的解决上述存在的不足,为多残留免疫分析技术提供新的研究思路,并有可能发展为新的研究方向。

3.2 双特异性单克隆抗体技术为农兽药多残留免疫分析技术发展提供新思路

采用细胞工程法中的四体杂交瘤技术制备的双特

异性单克隆抗体,与以往的采用化学偶联的方法制备的双特异性抗体相比具有抗体形状更加稳定、产量不受限制等独特优势,根据其特性,将双特异性单克隆抗体应用与小分子药物的多残留免疫快速分析必将是未来的趋势。本试验在前期制备双特异性单克隆抗体的基础上,经过一系列的条件如包被缓冲体系、离子强度、有机溶剂和 pH 值等的优化,建立双特异性单克隆抗体的最佳 ELISA 分析技术,并通过对水、土壤等环境样品的添加回收率分析,根据试验结果说明所制备的双特异性单克隆抗体其抗体特性形状稳定,添加回收率结果显示,所建立的 ELISA 分析方法可信度高,可用于环境样品的检测。

3.3 本试验还需进一步开展研究的问题

本论文是在抗克百威-三唑磷双特异性单克隆抗体基础上建立 ELISA 分析方法,该方法主要针对单一目标化合物开展检测,而多残留分析待测样品中往往同时含有多种目标化合物,之间会有相互干扰,会影响分析的精度,因此,下一步将重点开展样品中多种目标化合物同时存在下的检测分析方法研究,分析多药物残留下的信号叠加效应,并建立新的评价指标和判定标准,以更好的发挥双特异性单克隆抗体在多残留免疫分析中的应用价值。

4 结论

本论文以抗克百威-三唑磷双特异性单克隆抗体为研究对象,通过对反应缓冲体系条件的优化和筛选,建立最佳条件下的 ELISA 分析方法,并进行添加回收率试验,从添加回收率试验结果说明所建立的 ELISA 分析方法适合于水、土壤等环境样品的检测,具有很好的应用价值,说明双特异单克隆抗体能应用于农兽药多残留快速免疫分析技术,下一步将重点开展混合样品的分析技术研究。

参考文献:

[1] 罗小勇. 农药残留及其对策[J]. 中国农学通报, 2009, 25(18): 344-347

[2] Samarajeewa U, Wei C I, Huang T S. Application of immunoassay in the food industry[J]. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1991, 29:403-434

[3] Alcocer, M J C, Dillon P P, Maming B M, Doyen C, Lee H A, Daly S J, O' Kennedy R, Morgan M R A. Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, 48(6):2228-2233

[4] 骆爱兰, 余向阳, 张存政, 祝树德, 刘贤进. 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

[5] Wang S T, Gui W J, Guo Y R, Zhu G N. Preparation of a multi-hapten antigen and broad specificity polyclonal antibodies for a multiple pesticide immunoassay[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 587: 287-292

[6] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256: 495-497

[7] Milstein C, Cuello A C. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry[J]. *Nature*, 1983, 305:537-540

[8] Suresh M R, Cuello A C, Milstein C. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas[J]. *Methods Enzymol*, 1986, 121: 210-228

[9] 李荔, 陈伯权. 抗肾综合征出血热病毒和抗辣椒过氧化物酶的双特异性单克隆抗体的建立[J]. *病毒学报*, 1989, (4):334-339

[10] 全昱东, 赵莉, 程明, 卢锦汉. 角蛋白和过氧化物酶双特异性杂交交瘤的建立[J]. *单克隆抗体通讯*, 1990, 6(1):20-23

[11] Ferrini S, Prigione I, Miotti S, Ciccone E, Cantoni C, Chen Q, Colnaghi M I, Moretta L. Bispecific monoclonal antibodies directed to CD16 and to a tumour-associated antigen induce target-cell lysis by resting NK cells and by a subset of NK clones[J]. *International Journal of Cancer*, 1991, 48:227-235

[12] Jin R Y, Guo Y R, Wang C M, Wu J X, Zhu G N. Development of a Bispecific Monoclonal Antibody to Pesticide Carbofuran and Triazophos Using Hybrid Hybridomas[J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(1):1-6

[13] 朱国念, 吴银良, 程敬丽. 克百威人工抗原的合成与鉴定[J]. *浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2002, 28(1):47-53

[14] Gui W J, Jin R Y, Chen Z L, Cheng J L, Zhu G N. Hapten synthesis for enzyme-linked immunoassay of the insecticide triazophos[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 357:9-14

[15] 陈伯权, 吴美英, 叶群瑞. 几种部分纯化单克隆抗体方法的比较[J]. *病毒学报*, 1990, 6(2):122-126

[16] Pullen S, Hock B. Development of enzyme immunoassays for the detection of pyrethroid insecticides 2 polyclonal antibodies for pyrethroid insecticides[J]. *Nalytical Letters*, 1995, 28(5):781-795

[17] Mark S K, Shan G M, Lee H J, Werner I. Development of a class selective immunoassay for the type II pyrethroid insecticides[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534:109-120

[18] 祝金凤. II型菊酯类农药广谱特异性抗体的制备和多残留免疫技术的建立[D]. 扬州:扬州大学, 2008:1-32

[19] 杨挺, 皇甫伟国, 谢显传. 拟除虫菊酯类农药多残留的 IC-ELISA 检测方法研究[J]. *食品科技*, 2008, 33(12):291-294

[20] 李志茹. 拟除虫菊酯类农药通用抗体制备及高效氯氟氰菊酯免疫检测技术研究[D]. 南京:南京农业大学, 2004:1-30

[21] Colin M W, Andrew P W, Heather A L. Monoclonal anti idio type antibody mimicking the pesticide binding site of cutinase: potential for broad specificity organophosphate recognition[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1999, 224:197-202

[22] Sudi J, Heeschen W. Studies on the development of an immunoassay for the group specific detection of the diethyl ester of phosphates, thiophosphates, dithiophosphates and phosphonates[J]. *Kiel Milchwirtschafts Forschungsber*, 1988, 40:179-203

(下转第 531 页)

- mRNA expression levels of pituitary in Japanese white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. *Livestock Science*, 2011, 139(3):222-229
- [23] Sakurai H, Adams B M, Adams T E. Concentration of gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in pituitary tissue of orchidectomized sheep: effect of passive immunization against gonadotropin-releasing hormone [J]. *Journal of Animal Science*, 1997, 75(1):189-194
- [24] Gregg D W, Nett T M. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary [J]. *Biology of Reproduction*, 1989, 40(2):288-293
- [25] Murase M, Uemura T, Gao M, Inada M, Funabashi T, Hirahara F. GnRH antagonist-induced down-regulation of the mRNA expression of pituitary receptors: comparisons with GnRH agonist effects [J]. *Journal of Endocrinology*, 2005, 52(1):131-137
- [26] Awoniyi C A, Santulli R, Chandrashekar V, Schanbacher B D, Zirkin B R. Quantitative restoration of advanced spermatogenic cells in adult male rats made azoospermic by active immunization against luteinizing hormone or gonadotropin-releasing hormone [J]. *Endocrinology*, 1989, 125(3):1303-1309
- [27] Esbenshade K L. Ovarian response to pregnant mare serum gonadotropin and porcine pituitary extract in gilts actively immunized against gonadotropin releasing hormone [J]. *Journal of Animal Science*, 1987, 65(6):1768-1774
- *****
- (上接第 522 页)
- [23] Banks J N, Chaudhry M Q, Matthews W A. Production and characterisation of polyclonal antibodies to the common moiety of some organophosphorous pesticides and development of a generic type ELISA [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 1998, 10(4):349-361
- [24] Jang M S, Lee S J, Xue X P. Production and characterisation of monoclonal antibodies to a generic hapten for class specific determination of organophosphorus pesticides [J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2002, 23(8):1116-1121
- [25] 刘贤进, 严春荣, 刘媛, 余向阳, 张存政. 有机磷杀虫剂通用结构半抗原的设计及广谱特异性抗体的制备 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(3):727-733
- [26] Liang Y, Liu X J, Liu Y. Synthesis of three haptens for the class specific immunoassay of O, O dimethyl organophosphorous pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 615(2):174-183
- [27] 魏东, 杨正涛, 李颖, 郭昌明, 刘辉, 张乃生. 氟啶酮类药物残留免疫学检测方法的研究 [J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(12):1593-1598
- [28] Wang Z H, Zhu Y, Ding S Y, He F, Beler R C, Li J, Jiang H, Feng C, Wan Y, Zhang S, Kai Z, Yang X, Shen N J. Development of a Monoclonal Antibody Based Broad Specificity ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics in Foods and Molecular Modeling Studies of Cross Reactive Compounds [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(12):4471-4483
- [29] Zhang H Y, Duan Z J, Wang L, Zhang Y, Wang S. Hapten synthesis and development of polyclonal antibody based multi-sulfonamide immunoassays [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54:4499-4505
- [30] Spinks C A, Wyatt G M, Lee H A, Morgan M R. Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulfonamide antibodies [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10:583-588
- [31] Cao Y, Suresh M R. Bispecific Antibodies as Novel Bioconjugates [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1998, 9(6):635-644