

赛庚啶 ELISA 检测试剂盒的研制及其性能评价

黄士新¹, 李丹妮¹, 顾欣¹, 黄华², 陈亮², 王学生²

(1. 上海市动物疫病预防控制中心, 上海 201103; 2. 上海容晖生物科技有限公司, 上海 200231)

[收稿日期] 2016-08-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 11-0044-05 [中图分类号] S859.8

[摘要] 基于直接竞争法原理酶联免疫技术研制了一种测定动物尿液中赛庚啶(CHP)残留量的检测试剂盒, 并对试剂盒的检测限、特异性和稳定性等参数进行确定。通过在 CHP 分子上引入活性羧基, 在 EDC 作用下分别偶联到 KLH、BSA 上形成 CHP-KLH 和 CHP-BSA 抗原, CHP-KLH 抗原免疫 BALB/C 小鼠制得抗 CHP 单克隆抗体, 经辣根过氧化物酶 HRP 标记抗 CHP 抗体, 采用 CHP-BSA 抗原包被酶标板, 最终成功构建动物尿样中 CHP 残留量的竞争酶联免疫法检测体系, 并进行性能测试评价。结果表明, 吸光度百分比值与 CHP 质量浓度的对数在 0.1~1.6 μg/L 呈线性关系, 相关系数 R^2 为 0.986, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.316 μg/L, 检测限为 0.158 μg/L, 回收率在 80%~110%, 变异系数为 2.0%~10.0%。方法具备良好的特异性, 可用于动物尿样、血清及组织中 CHP 残留的快速检测。

[关键词] 动物尿样; 赛庚啶; 竞争酶联免疫; 单克隆抗体; 试剂盒

Development and Performance Measurement of Cyproheptadine ELISA Test Kit

HUANG Shi-xin¹, LI Dan-ni¹, GU Xin¹, HUANG Hua², CHEN Liang², WANG Xue-sheng²

(1. Shanghai Animal Disease Control Center, Shanghai 201103, China; 2. Rohi Biotechnology Co. Ltd, Shanghai 200231, China)

Abstract: A direct competitive ELISA assay was developed in order to detect cyproheptadine in the samples of animal urine, and its technical parameters, such as sensitivity, specificity and stability were tested respectively. By introducing an active carboxyl group to cyproheptadine molecules, the hapten cyproheptadine was conjugated to keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA) by EDC method. Immunized the Balb/c mice with CHP-KLH antigen, the monoclonal antibodies against cyproheptadine were acquired. The monoclonal antibodies were labeled with horseradish peroxidase. Coated CHP-BSA antigen on the plate wells, the direct competitive ELISA assay was developed for detecting cyproheptadine in the samples. The results showed that the logarithm of cyproheptadine concentration with the absorbance percentage shows a linear relationship between 0.1~1.6 μg/L, the correlation coefficient R^2 is 0.986, the half inhibitory concentration (IC_{50}) is 0.316 μg/L, the detection limit for cyproheptadine the assay is 0.158 μg/L, the recovery is 80%~110%, the coefficient of variation is 2.0%~10.0%. This assay exhibits good specificity with no any cross reactions to terfenadine and

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203023); 上海市科技兴农重点攻关项目〔沪农科攻字(2014)第3-3号〕

作者简介: 黄士新, 农业推广研究员, 从事兽药残留检测与方法开发。E-mail: yure@yeah.net

clenbuterol. It could be used as rapid detection for the residual cyproheptadine in the samples such as animal urine, serum and tissues.

Key words: animal urine; cyproheptadine; competitive ELISA; monoclonal antibody; test kit

赛庚啶(Cyproheptadine, CHP)是一种抗组胺药物,也是一种H1受体拮抗药,同时具有抗5-羟色胺的作用,可抑制下丘脑的饱觉中枢而刺激食欲增加体重促进生长。在动物饲料和动物饮水中非法添加这种药物,会造成动物体内药物残留,严重危害人体的健康^[1~3]。农业部于2010年12月27日发布1519号公告,禁止在饲料和动物饮水中使用盐酸CHP^[4]。

目前动物尿液中CHP检测方法主要为液相色谱-串联质谱色法(LC/MS/MS)和高效液相色谱法(HPLC),但均存在检测时间长和检测成本高等缺点,不适用于快速筛查。本研究通过化学偶联的方法将CHP连接到载体蛋白上,成功制备了特异性识别CHP的单克隆抗体,并根据免疫竞争的原理,建立了一种适用于动物尿样、血样中CHP残留检测的酶联免疫检测体系,还成功研制出商品化快速检测试剂盒,以期为现场筛查提供具有操作简单、灵敏高、特异性好、检测时间短等优势的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 CHP标准品(纯度≥99%)、

碳化二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)(纯度≥99%)、牛血清白蛋白(BSA)、血蓝蛋白(KLH)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、聚乙二醇(PEG, Mw4000)、HAT及HT选择性培养基、8-氨基杂鸟嘌呤(8-AG)、二甲亚砜(DMSO)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等均购自美国Sigma公司;DMEM基础培养基、胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司;辣根过氧化物酶(HRP)购自上海雪满生物公司;N,N-二甲基甲酰胺(GR)等其他化学试剂购自国药集团,BABL/C小鼠来自上海交大医学院。

1.1.2 仪器与设备 酶标仪360T,上海科华公司;旋转蒸发仪R-215,Buchi Labortechnik AC;高速冷冻离心机CT14RDII,上海天美;紫外分光光度仪UV-7502PC,上海欣茂仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CHP抗原的制备^[5~7] 通过对CHP硝化还原在CHP侧苯环引入氨基得CHP-NH₂,CHP-NH₂再和溴丁酸合成半抗原CHP-COOH,其合成路线见图1。

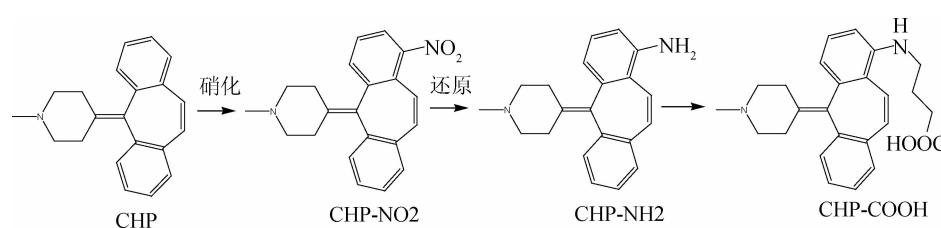


图1 半抗原 CHP 接臂合成路线

反应瓶中加入原料盐酸CHP 0.5 g 和 5 mL浓硫酸,搅拌溶解,分次加入浓硝酸和浓硫酸混合物,反应得硝基化合物。将硝基化合物0.5 g溶于水中,搅拌下依次加入浓盐酸0.55 mL、锌粉0.62 g,反应2 h,抽滤得半固体状黄色物质,层析后得CHP氨基化合物CHP-NH₂。

加乙酸乙酯和吡啶反应处理后得半抗原CHP-COOH。将2 mg半抗原溶于pH为6.0的2-吗啉乙酸(MES)水溶液中,4℃搅拌过夜。对0.01 mol/L pH7.2 PBS透析48 h可收集赛庚啶的完全抗原CHP-KLH。抗原CHP-BSA或CHP-OVA制备方法相同。

1.2.2 CHP 抗体制备^[8-9] 将 CHP-KLH 的免疫抗原按 50 μg/mL 只的剂量与等体积弗氏佐剂充分乳化后, 腹部皮下多点注射免疫 4 只 6~8 周龄雄性 BALB/C 小鼠, 免疫 7~10 d, 尾静脉采血, 间接 ELISA 检测血清效价。将免疫效果较好的小鼠脾脏与骨髓瘤细胞 SP2/0 通过 PEG 介导融合, 间接 ELISA 筛选阳性克隆; 阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株, 细胞株扩大培养后, 接种经降植烷致敏 BALB/C 小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水^[8]。腹水经硫酸粗纯化, 再辛酸硫酸法纯化得相应单抗^[8]。

用辣根过氧化物酶(HRP)标记 CHP 单克隆抗体, 采用过碘酸钠法(改良法)标记。取 1 mg CHP 单克隆抗体在 50 mM pH9.6 碳缓冲液 CBS 中透析过夜, 加入 0.5 mg 经过碘酸钠醛化的 HRP 溶液, 4℃ 反应 2 h; 加入硼氢化钠溶液终止反应, 将溶液装入透析袋中, 在 PBS 中透析过夜; 透析完毕后取出, 加入等体积甘油, -20℃ 避光保存^[9]。

1.2.3 CHP 完全抗原的包被 用 50 mmol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将 CHP 抗原(CHP-BSA)稀释成系列浓度, 依次包被到 96 孔酶标板, 每孔包被量 100 μL, 浓度从 0.5~8 μg/μL。4℃ 孵育过夜, 将孔中液体倾去, 每孔加入 250 μL 0.5% BSA 10 mmol/L PBS pH 7.4 封闭, 于 37℃ 恒温箱中孵育 2 h, 将孔中封闭液倾去, 放入温度 37℃、相对湿度 20% 的烘房烘干, 铝箔包装存放 4℃ 待用^[8]。

1.2.4 样品检测 在每孔中加入 50 μL 系列浓度的 CHP 标准品溶液(或样品溶液)和 100 μL 稀释后的酶标 CHP 抗体, 25℃ 反应 30 min; 洗涤 4~5 次后加入 100 μL 底物显色液, 25℃ 显色反应

20 min; 最后加入 50 μL 终止液终止反应, 设定酶标仪于波长 450 nm 处测定吸光度值^[7]。

1.2.5 线性范围 用阴性猪尿配制不同浓度 CHP 系列标准溶液, 按要求对样品处理后, 在最优抗原-酶标抗体工作浓度下, 测定 OD₄₅₀ 值。

1.2.6 试剂盒检测限 取 20 份空白猪尿样本, 按要求测定后, 统计空白样本的质量浓度求得平均值(\bar{x})和标准差(s), 实际动物样尿液检测限定为平均值和 3 倍的标准差之和, 即 $\bar{x} + 3s$ 。

1.2.7 抗体的特异性 CHP 和类似药性的特非那定、盐酸苯氧丙酚胺、芬司匹利和克伦特罗等 4 种药物配成相应的浓度进行交叉反应, 得出各种药物的半数抑制浓度(IC₅₀), 然后计算交叉率, 交叉率 = IC₅₀(CHP)/IC₅₀(其他药物) × 100。

1.2.8 试剂盒的准确度和精密度 在空白猪尿样中分别添加不同浓度的 CHP 标准品, 添加浓度为 0.15、0.2、0.5 ng/mL, 每个浓度重复 3 次, 对 3 批试剂盒进行测定。

1.2.9 试剂盒稳定性试验 将试剂盒在 37℃ 环境中存放 7 d, 取出后按照试剂盒操作程序测定其标准曲线的 OD₄₅₀ 值, 并与 4℃ 存放条件下的同批次试剂盒标准曲线 OD₄₅₀ 测定值进行比较。

2 结果

2.1 线性范围 表 1 的实验结果表明, 在 0.1~1.6 ng/mL 浓度范围内, CHP 抗原、抗体的抑制反应最佳, 如图 2 所示吸光值在浓度 0.1~1.6 ng/mL 之间曲线形状呈指数形。B/B₀ 的百分比值与 CHP 质量浓度的对数呈现良好的线性关系(图 3), 线性回归方程为 $Y = -52.26X + 23.80$, 相关系数 R^2 为 0.986, 半数抑制浓度 IC₅₀ 为 0.316 ng/mL。

表 1 不同 CHP 浓度时 OD₄₅₀ 值

CHP/(ng·mL ⁻¹)	0	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
OD ₄₅₀	2.201	1.738	1.2855	0.9545	0.571	0.37

2.2 试剂盒检测限 20 份空白猪尿样本测得 CHP 残留平均值为 0.113 ng/mL, 标准差为 0.015 ng/mL, 根据 $\bar{x} + 3s$ 计算得此试剂量的检测限为 0.158 ng/mL, 为保证结果准确、可靠, 试剂盒

检测限确定为 0.2 ng/mL, 即 0.2 ng/mL 以下判定为阴性结果, 0.2 ng/mL 以上判定为阳性结果。

2.3 抗体的特异性 CHP 试剂盒与相似药物的交叉反应率实验结果见表 2, 表明 CHP 试剂盒与类似

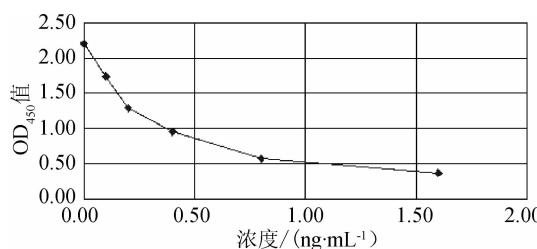


图 2 在 450nm 下不同赛庚啶浓度吸光值

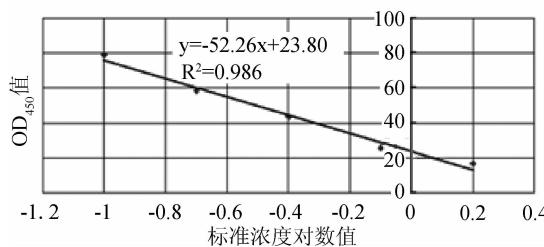


图 3 CHP 浓度取半对数的回归曲线

药性的特非那定、盐酸苯氧丙酚胺、芬司匹利和克伦特罗等 4 种药物无交叉反应,特异性较高。

2.4 试剂盒的准确度和精密度 平均添加回收率及变异系数计算结果如表 3 所示,猪尿中 CHP 药物的添加回收率在 80% ~ 110% 之间;在批内、批间的变异系数 1.8% ~ 9.4% 之间,表明该 ELISA 试剂盒具有良好的准确性和精密性,可以满足动物尿液中 CHP 药物残留测定要求。

表 2 CHP 抗体对其他药物的交叉反应率

药物名称	交叉反应率/%
赛庚啶(Cyproheptadine)	100
特非那定(Terfenadine)	<0.005
盐酸苯氧丙酚胺(Isoxsuprine)	<0.001
芬司匹利(Fenspiride)	<0.001
克伦特罗(Clenbuterol)	<0.001

表 3 准确度和精密度测定结果

添加浓度 / (ng·mL⁻¹)	平均回收率/%		
	批内 CV/%	批间 CV/%	
0.15	108	2.7	
	105	4.5	9.4
	90	6.0	
0.2	89	4.5	
	92	3.5	7.4
	103	3.0	
0.5	83	2.6	
	102	1.8	9.3
	96	3.2	

2.5 试剂盒的符合性 从试剂盒的假阴性、假阳性测定以及仪器检测样品比对情况评估其符合性。

2.5.1 假阴性率 在已确认的阴性样品中添加不同浓度的赛庚啶标准品,评价试剂盒的假阴性。阳性添加样本的测定结果均为阳性,未发现假阴性(表 4)。

表 4 CHP 的试剂盒假阴性评价结果

样品编号	添加值	试剂盒检测值	样品编号	添加值	试剂盒检测值
1	1.00	0.968	5	1.50	1.485
2	2.00	1.907	6	0.25	0.267
3	0.500	0.522	7	2.50	大于 1.6
4	0.400	0.373	8	3.50	大于 1.6

2.5.2 假阳性率 取 40 份经仪器确认的阴性尿样,试剂盒测定结果浓度低于 0.1 ng/mL 的有 32 份,浓度低于 0.2 ng/mL 的有 8 份,结果判定均为阴性,未出现假阳性。

2.5.3 与仪器测定进行比对 取 50 份空白猪尿样品,随机添加 CHP 标品,制得 50 份盲样,分别采用 ELISA 试剂盒液相色谱-串联质谱进行测定,仪器方法参照 DB31/T《猪尿中赛庚啶残留量的测定 酶联免疫吸附法与液相色谱-串联质谱法》所述进行操作。经检测 40 份样品确认为阴性,10 份

检测结果大于 0.2 ng/mL,判定为阳性,ELISA 检测结果与液相色谱-串联质谱检测结果相符,表明此试剂盒的符合性高。

2.6 试剂盒的稳定性 根据生化试剂在 37 °C 稳定 7 d 相当于 4 ~ 10 °C 稳一年左右的原则,在 37 °C 条件下进行加速稳定性试验。试剂盒在 37 °C 7 d 中阴性值吸光值仅降了 5% 左右。试剂盒在 37 °C 7 d 标准曲线和存放 4 °C 时曲线变化较小(图 4),IC₅₀ 值分别 0.330 和 0.331,说明试剂盒在规定条件存放有效期一年左右。

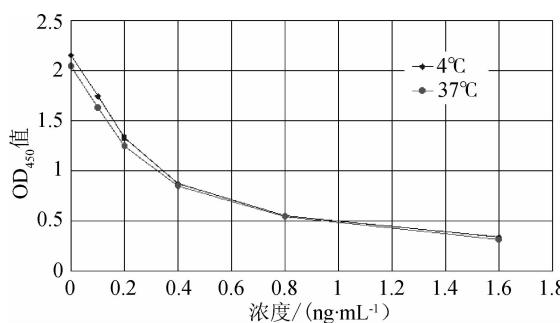


图4 赛庚啶试剂盒在37℃和4℃时吸光值和浓度变化

3 讨论

3.1 CHP 特异性抗体的制备 CHP 是小分子物质,本身不具备免疫原性,要制备 CHP 的抗体必须现将 CHP 小分子连接到一个大分子载体蛋白上,通过免疫动物来获得抗体。通过化学偶联的方法将 CHP 连接到载体蛋白上,首次成功制备了特异性识别 CHP 的单克隆抗体。

3.2 包被抗原 - 酶标抗体工作浓度选择 采用方阵试验法对直接竞争 ELISA 法中包被抗原和酶标抗体的稀释度进行筛选并确定工作浓度,一般原则选择 OD₄₅₀ 值 2.0 左右时的浓度组合作为最适工作浓度。试验分别比较了不同的酶标抗体稀释浓度 1:1000、1:5000、1:10000、1:20000,与不同包被抗原浓度 0.5~8.0 μg/mL 的浓度情况下的 OD₄₅₀,得到最优浓度组合为:抗原包被浓度为 1~2 μg/mL,酶标抗体稀释比 1:10000,此时的 OD₄₅₀ 值为 2.135~2.201。

本研究通过合成 CHP 完全抗原和免疫其动物制备相应的特异性单克隆抗体,建立了竞争 ELISA 试剂盒,经性能分析测试,说明此试剂盒特异性好、准确性和重复性高等特点,完全适用于检测部门、中小企业以及生畜养殖业对动物尿样、血清和组织中的赛庚啶残留检测,同时也为食品和饲料中赛庚啶残留的监控提高了便捷、灵敏、快速的检测方法。

参考文献:

- [1] 陈其煌. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪尿液中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶[J]. 福建农业学报, 2012,(6):596~600.
- [2] 黄炎坤, 韩占兵, 王娟娟, 等. 氯丙嗪和赛庚啶对黄羽肉种鸡产蛋性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008,(1):35~36.
- [3] 万宇平, 罗晓琴, 郝小妹, 等. 动物组织中赛庚啶竞争酶联免疫法的建立[J]. 中国酿造, 2014, 10:130~132.
- [4] 中华人民共和国农业部第 1519 号公告 [S].
- [5] Kuhn W E. Organic Syntheses Coll [M]. New York Organic Syntheses, Inc. Vol. 2, 1943: 447.
- [6] Kuhn W E. Organic Syntheses Coll [M]. New York Organic Syntheses, Inc. Vol 13, 1933:74.
- [7] Prugh John D. Piperidylidene derivatives of cyano-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene [P]: United States, US 3988342, 1976-10-26.
- [8] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [9] 巴德年. 当代免疫技术与应用 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998.

(编 辑:李文平)