

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.07

可乐定 ELISA 检测试剂盒的研制及其性能评价

李丹妮¹, 顾欣¹, 黄华², 陆沛嗣², 王学生², 黄士新^{1*}

(1.上海市兽药饲料检测所, 上海 201103; 2.上海容晖生物科技有限公司, 上海 200231)

[收稿日期] 2017-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0040-06 [中图分类号] S859.84

[摘要] 通过制备可乐定完全抗原, 免疫新西兰大白兔, 得到特异性多克隆抗体, 和 HRP 标记的羊抗兔构建间接 ELISA 检测法试剂盒, 并进行性能测试评价。结果表明, 吸光度百分比值与可乐定质量浓度的对数在 0.1~8.1 $\mu\text{g/L}$ 呈线性关系, 相关系数 R^2 为 0.977, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.675 ng/mL , 检测限为 0.2 ng/mL , 在浓度为 0.15~0.5 ng/mL 添加范围内, 回收率为 81%~109%, 具备良好的特异性, 可用于动物尿样、血清和组织中的可乐定残留检测。

[关键词] 可乐定; 酶联免疫吸附测定; 多克隆抗体; 试剂盒

Development and Performance Measurement of Clonidine ELISA Test Kit

LI Dan-ni¹, GU Xin¹, HUANG Hua², LU Pei-si², WANG Xue-sheng², HUANG Shi-xin^{1*}

1. Shanghai Municipal Institute of Veterinary Drug and Feedstuff Control, Shanghai 201103, China; 2. Rohi Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 200231, China

Corresponding author: HUANG Shi-xin, E-mail: yure@yeah.net

Abstract: An indirect competitive ELISA assay with preparing specific anti-clonidine polyclonal antibody was developed for the rapid detection of clonidine in the animal urine. The results showed that the logarithm of clonidine concentration with the absorbance percentage shows a linear relationship between 0.1~8.1 ng/mL , the correlation coefficient R^2 is 0.977, the half inhibitory concentration (IC_{50}) is 0.675 ng/mL , the detection limit for the clonidine assay is 0.159 ng/mL , the sample recovery is 81%~109%, the variation coefficient is 3.7%~9.2%. This assay exhibits good specificity with no any cross reactions to β -agonists. It could be used as rapid detection for the residual clonidine in the samples such as animal urine, serum and tissues.

Key words: clonidine; competitive ELISA; polyclonal antibody; test kit

可乐定 (Clonidine) 化学名 [2-(2,6-二氯苯基)亚氨基]咪唑啉, 是一种通过刺激脑干 α_2 -肾上腺受体动物剂, 能抑制中枢神经降低血压药物。同时可乐定是咪唑啉衍生物具有激发与促进垂体增加

分泌生长激素 (GH) 的作用, 故可乐定还可提高动物生长和改善胴体品质^[1-3], 畜禽类饲养含有可乐定的饲料可以增加畜禽类体重和瘦肉率, 但可乐定毒副作用大、易积累, 食用含有可乐定残留的动物

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: 李丹妮, 高级畜牧师, 从事兽药残留检测与方法开发。

通讯作者: 黄士新。E-mail: yure@yeah.net

源性食品,对人体健康具有相当的危害。农业部 2010 年发布了 1519 号公告,向社会公布了禁止在饲料、动物饮用水和畜禽水产养殖过程中使用的药物和物质清单,可乐定已明确被列入其中^[4]。

近年来由于国家对瘦肉精类药物的监管力度不断加大,加强对饲料、经济动物尿样的可乐定残留检测是保障食品安全重要手段,目前检测动物组织、血液中可乐定残留的方法,主要是液相色谱-串联质谱法(LC/MS/MS)^[5-7],该方法灵敏度较高,但检测时间长、操作较繁琐、检测成本高,不适用于养殖业和现场快速筛查。本研究通过制备可乐定完全抗原,免疫新西兰大白兔产生特异性抗体,根据免疫竞争原理,采用抗原抗体特异性反应,建立了一种适用于动物尿液、组织中可乐定残留检测的酶联免疫检测试剂盒,具有操作简单、灵敏度高、特异性好、检测时间短等优点,适合基层和现场快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂 可乐定标准品(纯度 $\geq 99\%$),碳化二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)(纯度 $\geq 99\%$),牛血清白蛋白(BSA),卵白蛋白(OVA),弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)等均购自美国 Sigma 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(DMF)等其他化学试剂购自国药集团。

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; 紫外分光光度计 UV-7502PC, 上海欣茂仪器有限公司; Waters Xevo TM TQ MS, 超高效液相色谱—串联质谱仪, 配有电喷雾(ESI+)离子源(美国 Waters 公司); MassLynx v4.1 质谱工作站(美国 Waters 公司)。

1.2 方法

1.2.1 可乐定完全抗原的制备^[8-9] 在可乐定的苯环 4 位上引入胺基为商品化的阿可乐定(Apraclonidine),阿可乐定和丁二酸酐酰化反应形成 CLD-COOH 即接臂的可乐定半抗原,其合成过程见图 1,再经过缩合剂 EDC·HCl 和载体蛋白偶联成完全抗原。560 mg 盐酸阿可乐定(Apraclonidine hydrochloride)、200 mg 丁二酸酐置于 1 mL 吡啶和 3 mL 苯于反瓶,加热搅拌回流 5 h,待反应完全后,减压蒸去溶剂,固体加无水乙醇和活性炭一起搅拌,加热回流,滤除活性炭,滤液加入氯化氢乙醇溶液冷却形成结晶,过滤,用冷无水乙醇洗结晶,干燥得到可乐定的半抗原 CLD-COOH。将 10 mg CLD-COOH 半抗原、8 mg NHS 和 10 mg EDC 溶于 0.5 mL DMF 中(混合物 A),4℃ 搅拌过夜。次日,先将 30 mg BSA(OVA)溶于 3 mL 0.02 mol/L 的磷酸氢二钠溶液中,并将混合物 A 逐滴加入,室温搅拌 6 h。装入透析袋,用 0.01 mol/L pH7.2 的 PBS 透析,并换液 4 次,得到可乐定的完全抗原 CLD-BSA 或 CLD-OVA。

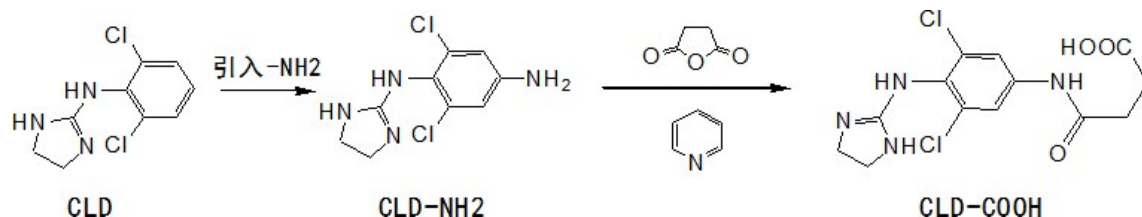


图 1 半抗原可乐定接臂合成路线

Fig 1 Synthesis scheme of clonidine hapten

1.2.2 可乐定多克隆抗体的制备^[10-11] 体重大约 2 kg 的新西兰雄性大白兔,采取背部皮下多点注射的

方式进行免疫。基础免疫时,取 200 μg (0.4 mg/mL) 的可乐定的完全抗原 CLD-OVA 溶液与等量的

CFA(弗氏完全佐剂)混匀乳化,直至形成乳白色的油包水型乳浊液,然后进行注射。2 周后进行加强免疫,免疫剂量为 100 μg 与等量的 IFA(不完全佐剂),以后每 7 d 加强免疫,次数为 3~4 次具体视情况而定,取耳缘静脉血,测血清效价,直到效价不再升高,采用颈动脉取血,离心得到血清。采用 CLD-BSA 免疫吸附凝胶进行亲和层析纯化,将得到的多克隆抗体加入一定比例的甘油,置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 可乐定完全抗原的包被^[11-12] 用 50 mmol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将可乐定抗原(CLD-BSA)稀释成系列浓度(0.5~8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$),依次包被到 96 孔酶标板,每孔包被量 100 μL 。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,将孔中液体倾去,每孔加入 250 μL 0.5% BSA 0.01 mol/L PBS pH7.4 封闭,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中孵育 2 h,将孔中封闭液倾去,放入温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 20% 的烘房烘干,铝箔包装封存 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.2.4 样品检测 动物尿液直接用于检测,如尿液浑浊,将尿液于 5000 r/min 离心 5 min 取上清液用于检测。在每孔中加入 50 μL 系列浓度的可乐定标准品溶液(或样品溶液)和 50 μL 稀释后的可乐定抗体,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min;洗涤 4~5 次后加入 100 μL 稀释后的酶标二抗,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min;洗涤 4~5 次后加入 50 μL 底物液 A 和 50 μL 底物液 B,25 $^{\circ}\text{C}$ 显色反应 15 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。

1.2.5 线性范围 称取可乐定盐酸盐标准品 10 mg,溶于 1 mL 甲醇溶液中制备 CLD 储备液,放在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。将储备液用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH7.2 PBS)稀释成 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL 系列质量浓度,在最优抗原-酶标抗体工作浓度下,测定 OD_{450} 值。各质量浓度所对应的抑制率 $I = B/B_0 \times 100\%$ (B_0 对应 0 ng/mL 的 OD 值),以 CLD 药物浓度对数为横坐标,抑制率为纵坐标做标准曲线。

1.2.6 试剂盒检测限 取 20 份空白样本,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),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 可乐定试剂盒与常见的 β -兴奋剂类,如莱克多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗等物质进行交叉反应,得出各种药物的半数抑制浓度(IC_{50}),然后计算交叉率,交叉率 = $\text{IC}_{50}(\text{可乐定}) / \text{IC}_{50}(\text{其他药物}) \times 100\%$ 。

1.2.8 试剂盒的精密度和准确度 在空白猪尿样中分别添加 0.15、0.2、0.5 ng/mL 的可乐定标准品,每个浓度重复 3 次,对 3 批试剂盒进行测定,计算变异系数(CV),以及计算回收率,回收率 = 实际测定的浓度/添加的浓度 $\times 100\%$ 。

1.2.9 试剂盒的符合性 对已确认的阴性样品中进行添加或不添加可乐定标准品进行测定,检测试剂盒的假阳性和假阴性,来评估它的符合性。

2 结果

2.1 线性范围 以吸光值为纵坐标和质量浓度为横坐标绘成曲线图 2,在 0.1~8.1 ng/mL 之间曲线呈指数形,图 3 是以吸光值 B/B_0 的百分比值为纵坐标和质量浓度的对数为横坐标作图,表明此试剂盒在 0.1~8.1 ng/mL 范围呈良好的线性,对曲线进行线性回归得直线方程为 $y = -40.01x + 42.84$,相关系数 $R^2 = 0.9777$,半数抑制浓度 IC_{50} 为 0.675 ng/mL。

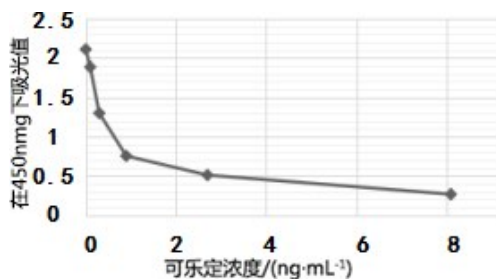


图 2 在 450nm 下不同可乐定浓度吸光值

Fig 2 Absorbance values of different clonidine concentration at 450nm

2.2 试剂盒检测限 20 份空白猪尿样测得可乐定残留平均值为 0.042 ng/mL,标准差为 0.039 ng/mL,根据 $\bar{x} + 3s$ 计算得此试剂量的检测限为 0.159 ng/mL,为保证结果准确、可靠,试剂盒检测限确定为

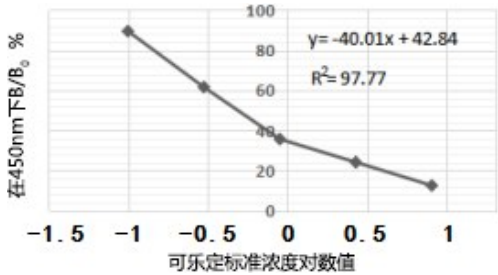


图 3 可乐定浓度对数吸光度百分比

Fig 3 Standard curve of clonidine-Kit

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 可乐定试剂盒与常见的β-兴奋剂类,例莱克多巴胺、沙丁胺醇、克伦特罗等物质的交叉情况检测结果见表 1,表明可乐定试剂盒与β-兴奋剂类无交叉反应。

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 2 所示,从表中看到可乐

表 1 可乐定抗体对其他药物的交叉反应率
Tab 1 The percent cross reactivity of clonidine-Kit with beta-agonists

药物名称	交叉反应率/%
可乐定	100
莱克多巴胺	<0.005
沙丁胺醇	<0.001
盐酸克伦特罗	<0.001

定药物在猪尿中的添加回收率在 81%~109%之间;在批内、批间的变异系数 3.7%~9.2%之间,表明该 ELISA 试剂盒具有良好的准确性和精密性。

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可乐定标准品,评价试剂盒的假阴性。添加 6 份样本,测定结果见表 3,均为阳性,未发现假阴性。

表 2 准确度和精密度测定结果

Tab 2 Recovery test of clonidine added to sample by clonidine-Kit

添加浓度/(ng·mL ⁻¹)	平均回收率/%	批内 CV/%	批间 CV/%
0.15	89	3.7	7.4
	93	4.9	
	81	5.0	
0.2	109	4.1	9.2
	96	6.5	
	105	7.0	
0.5	88	5.6	8.4
	91	3.8	
	85	6.9	

表 3 可乐定的试剂盒假阴性评价结果

Tab 3 False negative result of clonidine -Kit

			ng/mL		
样品编号	添加值	实测值	样品编号	添加值	实测值
1	0.40	0.388	4	2.00	1.987
2	0.50	0.512	5	5.00	5.043
3	1.00	0.973	6	10.00	>8.1

2.5.2 假阳性率 取 20 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 18 份,浓度低于 0.2 ng/mL 的有 2 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,随机添加可乐定标品,制得 50 份盲样,分别采用 ELISA 试剂盒和液相色谱-串联质谱进行测定,仪器方法参照文献^[10]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。

3 讨论

3.1 包被抗原-可乐定抗体-酶标二抗工作浓度选择 采用方阵试验法对间接竞争 ELISA 法中包被抗原、可乐定抗体和酶标二抗的稀释度进行筛选并确定工作浓度,工作浓度优化根据实际使用时阴性样的检测 OD₄₅₀ 为 2.0 左右原则进行调试。将 HRP-羊抗兔 IgG 分别作 1 : 3000、1 : 4000、1 : 5000 和 1 : 6000 倍稀释,用包被好的 ELISA 板测其 OD 值,选择最合适酶标二抗浓度和包被浓度。通过方阵试验得到最优浓度组合为:抗原包被浓度为 1~2 μg/mL,可乐定抗体浓度为 10 μg/mL,酶标二抗稀释比 1 : 5000,此时的 OD₄₅₀ 值 2.1 左右。

3.2 试剂盒的性能 关键影响因素抗体的特异性和效价决定了试剂盒的性能,这两点又和免疫抗原及免疫方式相关,本研究在不改变可乐定分子结构特征基础上进行接臂,通过臂上基团偶联到载体蛋白上,以避免载体蛋白(BSA 或 OVA)掩蔽可乐定小分子的抗原性,提高免疫效果和效价。在免疫方式上采用抗原和弗氏完全佐剂及不完全佐剂联合应用,适当减少每次免疫剂量,采用小剂量延长免疫周期方式来提多克隆抗体的效价和特异性。

本研究建立了竞争 ELISA 试剂盒,经性能分析测试,证明此试剂盒具有特异性好、准确性和重复性高等特点,适用于对动物尿样、血清和组织中的可乐定残留快速检测,为可乐定残留的监控提高了灵敏高、准确性好、快速便捷的检测方法。

参考文献:

- [1] 吴剑平, 张鑫, 顾欣, 等. 高效液相色谱法测定饲料中盐酸赛庚啶和盐酸可乐定含量[J]. 中国饲料, 2014, 13: 33-36.
Wu J P, Zhang X, Gu X. Determination of cyproheptadine hydrochloride and clonidine hydrochloride in feed by high performance liquid chromatography [J]. China Feed, 2014, 13: 33-36.
- [2] 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, 27(6): 596-600.
Chen Q H. HPLC-MS/Ms determination of clonidine hydrochloride and cyproheptadine hydrochloride contents in swine urine [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27(6): 596-600.
- [3] 黄士新, 李丹妮, 顾欣, 等. 赛庚啶 ELISA 检测试剂盒的研制及其性能测试[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 44-48.
Huang S X, Li D N, Gu X. Development and performance measurement of cyproheptadine ELISA test kit [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(11): 44-48.
- [4] 农业部第 1519 号公告. 禁止在饲料和动物饮水中使用的物质名单[S].
Announcement of the Department of Agriculture No. 1519. The prohibited list of substances used in feed and animal drinking water[S].
- [5] 许秀琴, 杨挺, 赵健, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶[J]. 安徽农业科学, 2015, (22): 216-218, 244.
Xu X Q, Yang T, Zhao J. Determination of clonidine hydrochloride and cyproheptadine hydrochloride in swine tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2015, 43(22): 216-218, 244.
- [6] 杨挺, 许秀琴, 赵健, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪血中盐酸可乐定和盐酸赛庚啶[J]. 肉类研究, 2015, (6): 25-28.
Yang T, Xu X Q, Zhao J. Determination of clonidine hydrochloride and cyproheptadine hydrochloride in swine tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Meat Research, 2015, (6): 25-28.
- [7] 陈其煌. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中可乐定和赛庚啶[J]. 浙江农业学报, 2013, (3): 623-629.
Chen Q H. High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of clonidine and cyproheptadine in pork liver [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, (3): 623-629.

- [8] 李卫芬, 程敬丽, 朱国念, 等. 一种克伦特罗半抗原化合物、合成方法及其用途[P]. CN 1793108A, 2006-01-06.
- Li W F, Cheng J L, Zhu G N. A type of cronterol semi-antigen compound, synthetic method and its use[P]. CN 1793108A, 2006-01-06.
- [9] Yan Zhang, Fengxia Wang, Li Fang, *et al.* Rapid Determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme-linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects[J]. J Biomed Biotechnol, 2009, ID 579175, 9.
- [10] Cooper K M, Caddell A, Elliott C T, *et al.* Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurantiazolidone [J]. Anal Chim Acta, 2004, (520): 79-86.
- [11] 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: 451-457.
- Zhu L P, Chen X Q. Experimental methods for immunology [M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2000: 451-457.
- [12] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 357.
- Ba D N. Contemporary technology and application. [M]. Beijing: Beijing Medical University, China Union Medical University Joint Publishing House, 1998: 357.

(编辑: 李文平)