

# 双黄连注射剂中半抗原物质 ELISA 检测方法的研究\*

★ 张启云 张卓辉 张增珠 徐国良\*\* (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

**摘要:**目的:研究双黄连注射剂中半抗原物质的 ELISA 检测方法。方法:将双黄连注射剂与正常动物血清体外孵育制备完全抗原,免疫动物获得针对双黄连中过敏性半抗原的特异性抗体,ELISA 法检测其效价显示,血清稀释至 1:128 时仍为阳性,按优化条件用间接竞争 ELISA 法测定血清特异性并绘制抑制曲线。结果:得到回归方程  $I = 13.362 \lg C + 50.503$ , 相关系数  $r = 0.9663$ , 检测限为  $0.93 \mu\text{g/ml}$ , 半数抑制浓度  $IC_{50} = 0.92 \text{ mg/ml}$ 。结论:本文建立的方法可以很好地用于双黄连注射剂中半抗原物质检测。

**关键词:**双黄连注射剂;半抗原;ELISA  
中图分类号:R 285.5 文献标识码:A

## The Study on ELISA Detection Method of the Semi Antigenic Substance of Shuanghuanglian Injection

ZHANG Qi-yun, ZHANG Zhuo-hui, ZHANG Zeng-zhu, XU Guo-liang

Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004

**Abstract:** Objective: To study the detection of the semi antigenic substance of Shuanghuanglian Injection. Methods: To prepare complete antigen by incubation of Shuanghuanglian Injection and blood serum of normal animal in vitro, the animal was immuned to get the specific antibody that aims directly at the allergia incomplete antigen of Shuanghuanglian Injection. Results: The potency detected by two-site ELISA assay demonstrates positive until the serum diluted to 128 folds, serological specificity detected by the indirect competitive inhibition elisa to draw restrain curve according to the optimum conditions, and the regression equation was  $I = 13.362 \lg C + 50.503$ , coefficient correlation,  $r = 0.9663$ , detection limit was  $0.93 \mu\text{g/ml}$ , half inhibiting concentration  $IC_{50} = 0.92 \text{ mg/ml}$ . Conclusion: This method can be used well in the detection of semi antigenic substance of Shuanghuanglian Injection.

**Key words:** Shuanghuanglian Injection; incomplete antigen; ELISA

双黄连注射剂是由金银花、黄芩、连翘提取精制而成的针剂,有粉针剂和注射液两种剂型,具有良好的抗病毒作用<sup>[1]</sup>,常用于治疗病毒和细菌引起的感染<sup>[2]</sup>。但由于双黄连注射剂为复方制剂,成分较为复杂,其中某些小分子物质(如绿原酸)或其代谢产物作为半抗原与体内血浆蛋白结合形成高致敏原,诱发皮疹、药热、过敏性休克等变态反应,占双黄连注射剂临床不良反应的 75%<sup>[3]</sup>。

对于分子结构明确的单一小分子半抗原,多采

用化学偶联的方法与蛋白质等大分子物质合成完全抗原后免疫动物制备特异性抗体,再利用免疫分析技术进行检测<sup>[4,5]</sup>。但双黄连注射剂中引起过敏反应的半抗原物质尚不明确,无法采用化学偶联的方法制备完全抗原,故本实验模拟双黄连注射剂进入体内后的致敏过程,将双黄连注射剂与正常兔血清体外孵育制备完全抗原,免疫雄性新西兰兔获得针对双黄连中过敏性半抗原的特异性抗体,建立了双黄连中半抗原物质的 ELISA 检测方法,为进一步研

\* 基金项目:江西省卫生厅基金资助项目(2007A024)

\*\* 通讯作者:徐国良, Tel: 0791-7118657; E-mail: xuguoliang6606@126.com

究双黄连注射剂中过敏性物质奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

药品与试剂:碘酒;双黄连冻干粉针剂(哈药集团中药二厂,批号:0602002);羊毛脂;液体石蜡;卡介苗(上海生物制品研究所,批号:2005070101);牛血清白蛋白(BSA)(国药集团化学试剂有限公司,批号:F20060119);金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白A交联的辣根过氧化酶(HRP-SPA)(上海生物制品研究所,批号:20030501);吐温-20(浙江省温州清明化工厂);柠檬酸、邻苯二胺(OPD)为化学纯;其它试剂均为分析纯;水为双蒸水。

仪器:AE240电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);HH-4数显恒温水温锅(国华电器有限公司);XW-80A旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);Eppendorf管;96孔培养板(美国costar公司);TGL-16G台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Thermo Multiskan MK3型酶联免疫检测仪(Thermo Lab-systems);一次性注射器;移液枪;冰箱。

实验动物:雄性新西兰白兔,体重2.0~3.0 kg,由江西医学院实验动物中心提供,合格证号:96-201。

### 1.2 方法

1.2.1 免疫全抗原的制备 精密称取双黄连冻干粉针剂充分溶解于生理盐水中制得3 mg/ml双黄连生理盐水溶液,与正常家兔血清充分混合,置37℃水浴锅中温育2 h,加入等体积弗氏佐剂用旋涡混合器乳化完全制成乳剂。其中双黄连终浓度为1 mg/ml,卡介苗终浓度为1 mg/ml(弗氏完全佐剂)。

1.2.2 特异性抗体的制备 选择2~3 kg的雄性新西兰白兔,免疫前取1.0 ml的血清作为阴性对照。首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化的抗原液,于兔背部脊柱两侧皮下多点注射,每点0.2 ml。10 d后以弗氏不完全佐剂乳化的抗原进行加强免疫,剂量与弱免疫相同。以后每7 d加强免疫1次,从第4次免疫开始,每次免疫后第7天经兔耳缘静脉采血测定抗体的效价,至效价达到理想值则颈总动脉取不抗凝全血,37℃温育2 h,4℃静置过夜,3000 r/min离心15 min,小心吸取上层抗血清分装后于-20℃保存。

1.2.3 ELISA测定抗血清效价 试剂的配制:0.05 mol/L pH 9.6的碳酸钠缓冲液:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59 g, NaHCO<sub>3</sub> 2.93 g溶于1 000 ml双蒸水中;0.15 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS):KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 9 g, NaCl 8 g, KCl 0.2 g,加双蒸水

至1 000 ml;2% BSA:2 g BSA用100 ml 0.15 mol/L pH 7.4磷酸盐缓冲液溶解;PBST:0.05 ml Tween-20用0.15 mol/L pH 7.4 PBS溶解且定容至100 ml;金黄色葡萄球菌细胞壁蛋白A交联的辣根过氧化酶(HRP-SPA):取冻干酶联葡萄球菌A蛋白纯品(1 ml/支)1支用0.15 mol/L pH 7.4 PBS按其工作浓度(1:40)稀释;底物液:A液(0.1 mol/L柠檬酸溶液)柠檬酸1.92 g加蒸馏水至100 ml, B液(0.2 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液)7.17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O加蒸馏水至100 ml,临用前取A液4.86 ml与B液5.14 ml混合,加入OPD 4 mg,待充分溶解后加入30%(v/v)的H<sub>2</sub>O 250 μl;终止液:取5.5 ml浓硫酸用水稀释至50 ml即为2 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液。

检测方法:以0.05 mol/L pH 9.6的碳酸钠缓冲液将抗原适当稀释后,每孔110 μl包被96孔板,4℃湿盒内包被过夜;取出后用PBST洗涤,每次4 min,洗涤3次后,每孔加入130 μl 2% BSA封闭过夜;倾去封闭液并洗涤,加入用0.15 mol/L pH 7.4的PBS 1:1、1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128稀释的抗血清100 μl,37℃温育2 h;洗涤后加入HRP-SPA,每孔100 μl,37℃孵育1 h;洗涤,加入底物液100 μl,混匀,室温避光显色15 min;加入50 μl 2 M的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应,并在450 nm波长下经酶标仪检测,读取每孔吸光度值(OD值),以加阴性血清的孔作为阴性对照,不加血清的孔作为空白对照。每一样品设3个平行孔,大于或等于阴性对照孔2倍OD值为阳性。

1.2.4 间接竞争ELISA (1)包被抗原最佳浓度的确定。将双黄连生理盐水溶液与正常兔血清37℃温育2 h所得抗原,按所含双黄连的量稀释为8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25 mg/ml,每孔110 μl包被酶标板,封闭洗涤后加入1:64稀释的抗血清100 μl,37℃温育2 h,洗涤3次,立即加入100 μl用PBS 1:40稀释的酶标抗体HRP-SPA,37℃温育1 h,洗涤3次,加100 μl底物液,室温避光作用15 min,加入50 μl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液终止反应,用酶标仪450 nm波长下检测每孔OD值。同时设空白对照孔(不加抗血清,只加稀释液)和平行重复孔,取空白对照的OD值<0.1,标准抗原的OD值为1.0左右者的抗原稀释度为最佳包被浓度。

(2)间接竞争ELISA测定方法 以最佳包被抗原浓度包被酶标板,封闭洗涤后分别加入0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/ml浓度的双黄连生理盐水溶液50 μl及1:64稀释的抗血清100 μl,37℃温育2 h;洗涤3次后加入1:40稀释的酶标抗体HRP-

SPA,每孔 100  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 温育 1h;剩余步骤同 1.2.4,在 450 nm 波长下读取每孔 OD 值,以加稀释液的孔作为空白对照,不加抑制物(双黄连)孔作为 0 标准孔,每一样品设 3 个平行孔。

抑制率 I (%) 按公式  $I = (OD_0 - OD) / (OD_0 - OD_{min}) \times 100\%$  计算<sup>[6]</sup>,其中 OD 为测定样品的吸光值,OD<sub>0</sub> 为 0 标准孔的吸光值,OD<sub>min</sub> 为空白对照孔的吸光值。以抑制率为纵座标,双黄连浓度的

对数值为横座标,绘制抑制曲线,通过回归分析,建立回归方程并计算相关系数 r,抑制率为 50% 时所对应的双黄连浓度(IC<sub>50</sub>)及检测限(IC<sub>10</sub>)。

## 2 结果

### 2.1 ELISA 测定抗血清效价

ELISA 法检测结果显示血清稀释倍数从 1:1 到 1:128 均为阳性,说明兔血清中已产生了抗体。结果见表 1。

表 1 兔抗双黄连注射剂抗血清效价 ELISA 测定( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

稀释倍数	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	阴性对照
OD <sub>450</sub>	2.8 $\pm$ 0.2	2.8 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.0

### 2.2 间接竞争 ELISA 测定血清特异性

2.2.1 包被抗原最佳浓度的确定 数据表明双黄连浓度为 1 mg/ml 时,OD<sub>450</sub> 值较接近于 1.0,因此确定其为最佳抗原包被浓度。结果见表 2。

表 2 包被抗原最佳浓度的测定结果(平均 OD<sub>450</sub> 值)

双黄连包被浓度(mg/ml)	8.00	4.00	2.00	1.00	0.50	0.25	空白对照
OD <sub>450</sub>	1.64	1.45	1.27	1.06	0.75	0.44	0.08

2.2.2 抑制曲线的绘制 以抑制率 I (%) 为纵座标,双黄连浓度的对数值为横座标,绘制抑制曲线(见图 1)。图中双黄连对抗血清的抑制率随其浓度的增大而升高,说明抗血清中的抗体是针对双黄连注射剂中半抗原产生的,具有一定特异性。通过回归分析,建立回归方程  $I = 13.362 \lg C + 50.503$ ,  $r = 0.9663$ ,半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> = 0.92 mg/ml,检测限为 0.93  $\mu$ g/ml。结果见表 3。

表 3 兔抗双黄连粉针剂血清特异性 ELISA 测定

双黄连浓度(mg/ml)	0.00	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	空白对照
OD <sub>450</sub>	0.26	0.19	0.18	0.17	0.17	0.16	0.09
I (%)	0.00	41.90	45.25	53.07	55.31	56.98	100.00

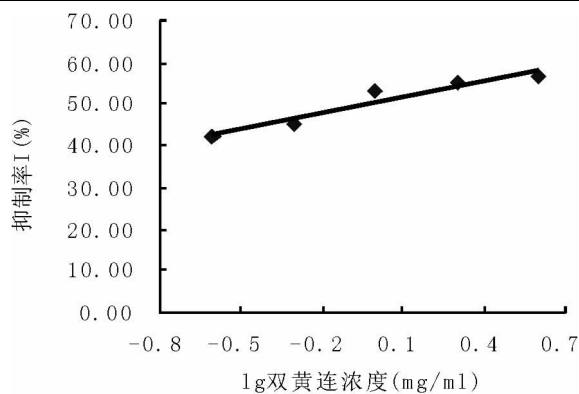


图 1 抑制曲线

## 3 讨论

免疫化学方法是近十多年来发展起来的新方法,具有较高的灵敏度和特异性,且对样品的纯度要求不高,其中 ELISA 方法由于操作简单、使用安全而被普遍应用于半抗原的检测。

完全抗原的合成及特异性抗体的制备是 ELISA 法检测半抗原中较为重要的一步,双黄连注射剂中的小分子半抗原物质结构不明确,无法采用化学偶联的方法连接到大分子蛋白质载体上形成具有免疫原性的完全抗原,故本实验采用将双黄连注射剂与正常兔血清体外孵育的方法制备完全抗原及其免疫血清,在此基础上建立了检测抗双黄连中半抗原物质抗体的间接 ELISA 方法。

### 参考文献

- [1] 李凡,易世红,赵春艳,等. 双黄连粉针剂抗病毒作用[J]. 中草药,2002,20(1):16.
- [2] 李文敏,王晓芝. 双黄连制剂的临床应用[J]. 医药导报,2001,20(7):448.
- [3] 方世平,王燕平,颜琳,等. 双黄连注射剂不良反应 10 年系统性定量分析[J]. 药物流行病学杂志,2005,14(3):148-151.
- [4] 张奇,李铁军,朱晓霞,等. 氨基甲酸酯类杀虫剂速灭威酶联免疫吸附分析方法研究[J]. 分析化学,2006,34(2):178-182.
- [5] 刘曙昭,冯大和,钱传范. 甲萘威酶联免疫吸附分析技术研究[J]. 农药学报,1999,1(1):62-68.
- [6] 于洪侠,杨曙明,朱宇. 莱克多巴胺多克隆抗体的制备[J]. 中国兽医科学,2006,36(01):62-65.

(收稿日期:2008-11-20)