

# 强力霉素单克隆抗体制备及 ciELISA 检测方法的建立

余少梅<sup>1,2</sup> 艾晓辉<sup>2</sup> 甘金华<sup>2</sup> 刘永涛<sup>2</sup> 索纹纹<sup>1,2</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

**摘要** 以人工合成的强力霉素-牛血清白蛋白(DC-BSA)为抗原免疫 BALB/C 小鼠,用间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 法选择细胞融合的备用小鼠;应用杂交瘤技术建立分泌 DC McAb 的杂交瘤细胞株,用体内诱生法制备 DC McAb,并对 DC McAb 的免疫学特性进行鉴定;应用 DC McAb 建立检测 DC 的 ciELISA 方法,并对其相关特性进行检测。结果表明:筛选后获得 1 株分泌特异性抗体的细胞 3D1-H4,细胞培养上清效价为 1:(8×10<sup>2</sup>),腹水效价为 1:(5.12×10<sup>5</sup>),抗体为 IgG1 型免疫球蛋白,与四环素、土霉素和金霉素分别有 8.87%、5.86%和 2.74%的交叉反应率,与其他抑制物无交叉反应性;ciELISA 检测方法的线性范围为 1.58~199.53 ng/mL,灵敏度为 2.88 ng/mL,半数抑制的质量浓度 IC<sub>50</sub>为 36.31 ng/mL,斑点叉尾鮰肌肉和肝脏样品中 DC 的平均添加回收率分别为 85.13%和 79.69%,平均批间和批内变异系数均小于 15%,不同基质对检测结果影响小。所建立的 ciELISA 方法可以应用于水产品中 DC 残留的检测。

**关键词** 强力霉素(DC);杂交瘤细胞;单克隆抗体;间接竞争酶联免疫吸附法(ciELISA);水产品;残留检测  
**中图分类号** S 948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0112-06

强力霉素(DC)又名多西环素、脱氧土霉素,是半合成的四环素类的抗菌药物。它具有抗菌活性高、组织穿透能力强、体内分布广泛、生物利用度高以及半衰期较长等优点,被广泛应用于兽医临床和水产养殖上<sup>[1]</sup>。四环素类抗生素是我国使用最多的药物添加剂,饲料中往往长期大量添加<sup>[2]</sup>,造成其在动物体内残留超标,人们长期食用,就会对人体产生毒性作用。我国出口的水产品,也因抗菌药物超标的问题,而多次遭到欧盟、美国、日本等国家的抵制。因此有必要建立更加高效准确的检测方法,对水产品中强力霉素残留进行监测。

我国农业部规定四环素类药物在动物组织中的最大残留限量为 0.1 mg/L,美国、日本、欧盟等也规定了该药物在动物组织中的最大残留限量为 0.1 mg/L<sup>[3]</sup>。目前 DC 的分析方法有微生物法、紫外法、高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>等,其中高效液相色谱法使用较多,具有很高的精确度,但需要昂贵的仪器,样品前处理复杂繁琐,并且需要专业人员操作仪器。而近年兴起的免疫学检测方法,具有简便、快速、灵敏等特点<sup>[7]</sup>,适于大量水产样品的初步筛查。本研

究应用杂交瘤技术,制备了较高特异性的抗 DC 单克隆抗体,并利用获得的抗体构建 DC ciELISA 检测方法,旨在为 DC ELISA 检测试剂盒的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

1)试剂。强力霉素(DC)标准品,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA),GIBCO 公司产品;RPMI-1640 培养基、小牛血清、PEG-4000、HRP-羊抗鼠 IgG、OPD,均为上海索莱宝生物科技有限公司产品;HAT、HT 选择性培养基,Sigma 公司产品;小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用 ELISA 试剂盒,洛阳佰奥通公司产品;三氯乙酸、氢氧化钠为上海国药集团产品;其他试剂均为国产化学纯试剂。

2)仪器设备。CO<sub>2</sub> 培养箱,德国 Memmert 公司产品;生物安全柜,ESCO 公司产品;倒置荧光显微镜,奥林巴斯(中国)有限公司产品;UV2802PC 紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;

收稿日期:2012-06-24

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划“渔药安全使用及快速检测技术研究”项目(2006BAD03B04-04)和中央公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2011JBFA19)

余少梅,硕士研究生。研究方向:水产品质量安全与渔业标准。E-mail: yuchyuch1234@163.com

通讯作者:艾晓辉,博士,研究员。研究方向:渔药药理及控制技术。E-mail: aixh@yfi.ac.cn

BIO-RAD 680 伯乐酶标仪,美国伯乐(Bio-Rad)公司产品;可拆卸96孔酶标板,96孔、24孔细胞培养板,细胞培养瓶,均为丹麦NUNC公司产品;旋涡混合器,北方同正生物技术发展有限公司产品。

3)细胞和小鼠。小鼠骨髓瘤细胞SP2/0由华中农业大学农业微生物国家重点实验室惠赠。7周龄BALB/C小鼠由中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心提供并代为饲养。

## 1.2 强力霉素单克隆抗体的制备

1)动物免疫。人工抗原DC-BSA为笔者所在实验室采用改进的碳二亚胺法合成,偶联比为3:1<sup>[6]</sup>。选取3只7周龄BALB/C小鼠,免疫前眼眶取血制备阴性血清。以DC-BSA为免疫原,每隔2周免疫1次,免疫量为100 μg/只,共免疫3次。其中首次免疫以DC-BSA与等量完全弗氏佐剂混合乳化注射,其余2次以DC-BSA与等量不完全弗氏佐剂混合乳化注射,注射时采用腹腔注射及皮下注射结合的方式。第3次免疫后第7天于眼下眶取血,分离血清后,以DC-OVA为包被原,通过间接ELISA<sup>[9]</sup>测定血清的抗体效价,通过间接竞争ELISA<sup>[9]</sup>测定血清半数抑制浓度。测定过程中,设置阴性血清对照和PBS空白对照,并以空白对照调零。

2)细胞融合与杂交瘤细胞株的筛选。于最后1次加强免疫前10 d,于BALB/C小鼠背部注射 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个SP2/0细胞,待长出实体瘤后,分离获得SP2/0细胞,具体方法参照文献<sup>[10]</sup>。融合前3 d,对免疫效果好,即抗体效价高、特异性好的小鼠进行加强免疫,不加佐剂。融合当天,分离制备脾细胞悬液,方法参照文献<sup>[11]</sup>。取小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)以10:1的比例,在促溶剂PEG-4000的作用下进行融合,将融合后的细胞以HAT培养液重悬,加入到已制备好饲养细胞的96孔板中,100 μL/孔,于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养,1周后逐步转入HT培养液中培养。待杂交瘤细胞长到孔底1/3时,用间接ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞,并用间接竞争ELISA法测定所产生抗体的特异性。选取抗体效价高、特异性强的阳性孔用有限稀释法<sup>[12]</sup>亚克隆3次,对单克隆细胞进行扩大培养并建株冻存。

3)DC McAb腹水的制备及其免疫学特性的测定。取7周龄的BALB/C小鼠注射弗氏不完全佐剂,0.5 mL/只。7 d后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细

胞 $5 \times 10^6$ 个,4 d后,观察小鼠情况,待腹部膨大、精神萎靡时,收集腹水。4℃下11 000 r/min离心30 min,去除上层油脂,取中间黄色清亮液体,随后用辛酸-硫酸铵法纯化腹水<sup>[13]</sup>,纯化腹水分装后,于-80℃保存。收集杂交瘤细胞的培养上清及纯化腹水,进行抗体亚型、效价及特异性的测定。

## 1.3 ciELISA检测方法的建立

1)DC McAb和DC-OVA工作浓度的确定。采用方正滴定法<sup>[14]</sup>确定DC McAb和DC-OVA的工作浓度。

2)ciELISA操作步骤。参照文献<sup>[9,12]</sup>以及前期对ciELISA条件的优化,建立ciELISA操作程序如下:①包被:用包被液将DC-OVA稀释至工作浓度后加入酶标板,100 μL/孔,37℃ 2 h或4℃过夜包被;②洗涤:甩掉包被液,用PBST洗板,250 μL/孔,静置3 min后甩干,重复4次,并在吸水纸上拍干;③封闭:加入5%羊血清,200 μL/孔,37℃封闭2 h后洗涤拍干;④加样:加入50 μL工作浓度的抗体和50 μL系列稀释的DC标准溶液,测定样品时,加入工作浓度的抗体和样品提取液,37℃孵育30 min后洗涤拍干,同时设置PBS空白对照和阴性对照;⑤加酶标二抗:加入HRP-羊抗鼠(用封闭液1:1 000倍稀释),100 μL/孔,37℃孵育30 min后洗涤拍干;⑥显色:加入OPD底物溶液,100 μL/孔,37℃下反应10 min;⑦终止:加入2 mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止液,50 μL/孔,用酶标板测定各孔OD<sub>490 nm</sub>值。若其值≥2.1倍阴性值,即判定为阳性。

3)标准曲线的绘制。配制DC标准溶液,使其质量浓度分别为0、0.78、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100、200、400 ng/mL,按照上述建立的ciELISA方法测定OD值,每个浓度做3个重复。以抑制率 $B/B_0$ ( $B_0$ 为DC质量浓度为0 ng/mL时的OD<sub>490 nm</sub>值, $B$ 为DC不同标准质量浓度的OD<sub>490 nm</sub>值)为纵坐标,以不同浓度的标准样品的对数值为横坐标,绘制标准曲线,建立回归方程,并进行相关回归分析。

4)样品的处理。参照叶妮等<sup>[15]</sup>的方法,并稍作改动。取出冰箱中斑点叉尾鲷肌肉及肝脏样品,在室温下解冻、匀浆后,称取1.00 g肌肉和肝脏样品分别放于10 mL离心管中,加入3%三氯乙酸(肌肉样品中4 mL,肝脏样品中9 mL),漩涡混匀提取60 min,4 000 r/min离心10 min,取上清200 μL于1.5 mL离心管中,加入1 mol/L NaOH溶液20 μL,混匀

后加入 0.01 mol/L PBS(肌肉样中 180  $\mu$ L, 肝脏样中 380  $\mu$ L), 混匀后离心取上清液作为试样液待测。

#### 1.4 ciELISA 方法性能的测定

1) 灵敏度。以检测限(LOD)来表示。测定 20 个不同批次的空白样品, 求得 OD 平均值( $B_0$ )和标准差( $S_D$ ), 在标准曲线上查出 $(B_0 - 2S_D)/B_0$ 值对应的 DC 质量浓度, 即为该方法的检测限。

2) 准确度。以样品添加回收率来表示。取空白鱼肉样品和肝脏样品, 分别添加 3 个质量分数水平的 DC 标样: 5、25、50 ng/g, 每个水平做 6 个重复, 计算回收率。

3) 精密度。通常以批内和批间变异系数来确定。取空白鱼肉样品和肝脏样品, 分别添加 3 个质量分数水平的 DC 标样: 5、25、50 ng/g, 每个水平设

置 6 个平行, 计算批内变异系数, 重复测定 3 次, 计算批间变异系数。

4) 样品基质影响实验。分别将 DC 标准品溶于 PBS、鱼肌肉处理液和肝脏处理液中, 使其质量浓度为 0、1.56、3.13、6.25、12.5、25、50、100、200 ng/mL, 测定 OD 值, 绘制标准曲线, 并进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫小鼠血清效价及特异性测定

由表 1 可知, 针对 DC-BAS 免疫原, 3 只小鼠的效价都达到了 1:8 000 以上, 说明小鼠产生了特异性的抗体, 表明人工抗原合成成功, 且免疫方案是可行的。其中鼠 M1 血清的抑制效果优于另外 2 只小鼠, 故选择鼠 M1 制备脾细胞。

表 1 血清效价测定 ( $n=3$ )

Table 1 ELISA absorbance of titers of serum ( $n=3$ )

免疫原 Hapten conjugate	鼠号 No.	血清稀释倍数 Serum dilution multiple						阴性血清(1 000) Negative
		4 000	8 000	16 000	32 000	64 000	128 000	
DC-BSA	M1	1.187	0.625	0.290	0.137	0.125	0.074	
	M2	0.907	0.424	0.253	0.133	0.079	0.073	0.124
	M3	0.807	0.429	0.184	0.124	0.079	0.075	

### 2.2 杂交瘤细胞株的建立

本试验共铺 4 块 96 孔板, 于第 8 天观察, 可观察到融合细胞的孔有 242 个, 融合率为 63%; 第 9 天取培养上清用间接 ELISA 进行检测, 阳性孔 37 个, 阳性率为 15.3%; 选取其中 10 个孔, 进行克隆和亚克隆, 最终得到 1 株分泌抗体效价高、特异性强的杂交瘤细胞 3D1-H4。

### 2.3 抗体亚型鉴定

收集杂交瘤细胞的培养上清, 用小鼠单抗亚型鉴定试剂盒进行鉴定。采用间接 ELISA 法检测, 证明 3D1-H4 单抗为 IgG1 型, 所以可以用辛酸-硫酸铵法纯化腹水。

### 2.4 抗体效价测定结果

采用间接 ELISA 法测定杂交瘤细胞培养上清和纯化腹水的效价。以阳性值/阴性值大于等于 2.1 时, 抗体的最大稀释倍数作为抗体效价。检测结果表明, 杂交瘤细胞分泌的 DC McAb 有着较高的效价, 细胞培养上清和腹水分别达到 1:( $8 \times 10^2$ ) 和 1:( $5.12 \times 10^5$ )。

### 2.5 抗体特异性

以 DC 及其他药物作为抑制剂, 采用间接竞争 ELISA 测定各抑制物的  $IC_{50}$ , 以单克隆抗体对 DC

的  $IC_{50}$  与其他抑制物的  $IC_{50}$  之比的百分数作为其交叉反应率。结果见表 2, DC McAb 对四环素、土霉素和金霉素的  $IC_{50}$  分别为 501.19、758.58、1 621.81 ng/mL, 交叉反应率分别为 8.87%、5.86% 和 2.74%, 与其他竞争药物无交叉反应性, 可知制备的抗体有着较好的特异性。

表 2 DC 单抗与其他药物的交叉反应率

Table 2 Cross-reactivity of DC McAb with other drugs

竞争物 Compounds	$IC_{50}/(ng/mL)$	交叉反应率/% Cross-reactivity
强力霉素 Doxycycline	44.46	100.00
四环素 Tetracycline	501.19	8.87
土霉素 Oxytetracycline	758.58	5.86
金霉素 Chlortetracycline	1 621.81	2.74
庆大霉素 Gentamicin	>10 000	<0.01
青霉素 Benzylpenicillin	>10 000	<0.01
螺旋霉素 Spiramycin	>10 000	<0.01
磺胺二甲嘧啶 Sulfanethazine	>10 000	<0.01
环丙沙星 Ciprofloxacin	>10 000	<0.01

### 2.6 DC McAb 和 DC-OVA 工作浓度的确定

方正滴定结果表明, DC McAb 的最佳工作浓度为 1:32 000, DC-OVA 最佳工作质量浓度为 2.5  $\mu$ g/mL。

### 2.7 标准曲线的绘制

DC 竞争抑制曲线见图 1, 曲线呈典型的 S 形,

曲线回归方程为  $y = -0.3591x + 1.0602$ , 相关系数  $R^2 = 0.9919$ , 线性范围为  $1.58 \sim 199.53$  ng/mL, 根据方程计算可知 DC McAb 对 DC 的  $IC_{50}$  为  $36.31$  ng/mL。

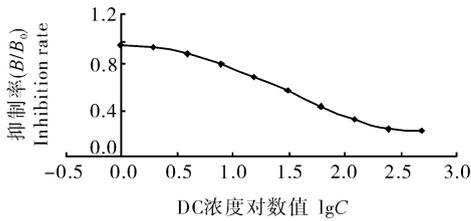


图 1 ciELISA 检测 DC 的标准曲线

Fig. 1 Standard curve for detection DC by ciELISA

### 2.8 灵敏度

ciELISA 检测 20 个空白样品后得到平均值  $B_0 = 1.002$ , 标准差  $S_d = 0.054$ , 算得  $LOD = 0.892$ , 带入公式可得 LOD 为  $2.88$  ng/mL, 即方法灵敏度为  $2.88$  ng/mL。

### 2.9 准确度和精密度

从表 3 中可知, 肌肉样品的回收率为  $80.88\% \sim 90.72\%$ , 平均  $85.13\%$ , 变异系数为  $7.90\% \sim 10.02\%$ , 平均  $9.01\%$ ; 肝脏样品的回收率为  $76.40\% \sim 84.56\%$ , 平均  $79.69\%$ , 变异系数为  $9.53\% \sim 12.30\%$ , 平均  $10.84\%$ 。样品的平均变异系数均小于  $15\%$ , 说明建立的方法有较高的准确度。

表 3 ciELISA 方法检测不同样品的添加回收试验和精密度

Table 3 Recovery test of DC added to different samples by ciELISA method

样品 Sample	DC 添加量/ (ng/mL) Amount of DC	回收试验 Recovery test (n=6)			精密度 Precision of DC measurement		
		测定值/(ng/mL) Measured mean value	回收率/% Recovery	变异系数/% CV	测定值/(ng/mL) Measured mean value	变异系数/% CV	
						批内 Inter batch (n=6)	批间 Intra batch (n=3)
肌肉 Muscle	5	4.19±0.42	83.80±8.40	10.02	4.41±0.35	7.94	5.74
	25	20.22±1.84	80.88±7.36	9.10	22.16±2.37	10.69	8.18
	50	45.36±3.60	90.72±7.20	7.90	40.26±4.11	10.21	6.20
肝脏 Liver	5	3.82±0.47	76.40±9.40	12.30	3.98±0.45	11.31	5.70
	25	21.14±2.26	84.56±9.04	10.69	19.72±2.64	13.39	6.67
	50	39.05±3.72	78.10±7.44	9.53	35.79±3.34	9.33	7.25

由表 3 可知, 肌肉组织批内变异系数为  $7.94\% \sim 10.69\%$ , 平均  $9.61\%$ , 批间变异系数为  $5.74\% \sim 8.18\%$ , 平均  $6.71\%$ ; 肝脏组织批内变异系数为  $9.33\% \sim 13.39\%$ , 平均  $11.34\%$ , 批间变异系数为  $5.70\% \sim 7.25\%$ , 平均  $6.54\%$ 。样品测定的平均批间变异系数小于批内变异系数, 且均小于  $15\%$ , 说明建立的方法有较高的精密度。

### 2.10 样品基质的影响

不同基质对测定结果是有一定影响的(图 2), 2 种鱼组织样品中, 肌肉处理液测得标准抑制曲线

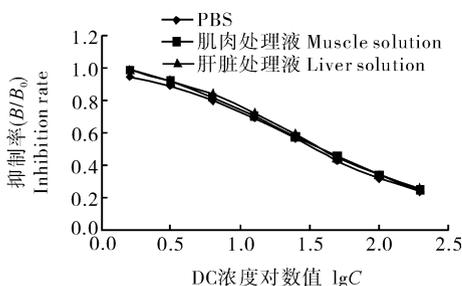


图 2 不同基质对 ciELISA 测定的影响

Fig. 2 Effect of different sample solutions to ciELISA assay

的  $IC_{50}$  为  $40.74$  ng/mL, 肝脏处理液的  $IC_{50}$  为  $41.69$  ng/mL, 而 PBS 的  $IC_{50}$  为  $36.31$  ng/mL, 存在差异, 但是相差不是很大, 说明样品的处理方法是可行的。

## 3 讨论

本研究应用单克隆抗体建立了水产品中强力霉素的酶联免疫检测方法。目前强力霉素检测常用的是 HPLC 法, 需要昂贵的仪器, 且样品的前处理比较复杂, 需要经过提取、脱脂、过柱净化等几道工序, 而 ELISA 法样品处理相对简单, 本研究提取稀释后, 只需一台酶标仪就可完成检测工作, 因此以 ELISA 检测法为基础的 ELISA 检测试剂盒在基层推广具有绝对的优势。本研究建立的 ciELISA 方法, 可为水产品中强力霉素 ELISA 试剂盒的研制奠定基础。

好的 ELISA 试剂盒的关键是高灵敏度和高特异性的单克隆抗体。本试验获得的抗 DC 单克隆抗体, 体内杂交瘤细胞 3D1-H4 诱生产生腹水的效价为  $1 : (5.12 \times 10^5)$ , 同四环素、土霉素和金霉素的

交叉反应率分别为 8.87%、5.86% 和 2.74%，灵敏度为 2.88 ng/mL。与其他四环素类药物存在交叉反应，主要是因为四环素类药物具有共同的分子骨架，结构相似。一般而言，半抗原越相似，则发生交叉反应的几率越大<sup>[16]</sup>。如环丙沙星和恩诺沙星，从分子结构、能量构象上都非常相似，杨先乐等<sup>[16]</sup>制备的抗环丙沙星抗体与恩诺沙星就有 95% 的交叉反应率。该抗体与氨基糖苷类的庆大霉素、大环内酯类的螺旋霉素、β-内酰胺类的青霉素、磺胺类的磺胺二甲嘧啶和喹诺酮类的环丙沙星无交叉反应性，说明其具有较高的特异性，可以应用于强力霉素的 ELISA 检测中。

一些研究者建立了猪组织样品中强力霉素的检测方法，能否应用在水产品检测中还有待考查。沈亚安<sup>[17]</sup>利用获得的多克隆抗体建立了间接竞争 ELISA 方法，检测范围为 1.96~160.00 μg/L。而乐涛<sup>[18]</sup>利用单克隆抗体建立的 ciELISA，方法检测范围为 1.79~80.00 μg/L，猪肌肉的平均添加回收率为 88.24%~89.19%，猪肝脏为 84.61%~85.54%。与上述研究相比，本研究建立的方法检测线性范围更广，为 1.58~199.53 ng/mL，斑点叉尾鲴肌肉样品的回收率为 80.88%~90.72%；肝脏样品的回收率为 76.40%~84.56%；平均批间和批内变异系数均小于 15%，满足 DC 残留检测的要求，为强力霉素 ciELISA 检测方法的研究提供了新的思路。

在实际工作中，样品的提取方法越简单越好，但同时要保证检测的灵敏度与准确度。沈亚安<sup>[17]</sup>用乙酸乙酯提取，氮气吹干后经 PBS 重悬后测定，本研究直接用三氯乙酸提取，稀释后直接测定，方法较其简单，而回收率不比其低，更具实用性。研究发现强力霉素在鱼组织和猪组织<sup>[18]</sup>中的回收率存在差异，另外，斑点叉尾鲴肝脏和肌肉中的回收率也不同，这可能是因为组织成分不同，强力霉素与蛋白结合程度不同，从而导致提取的强力霉素浓度不同，故测得的回收率不同。因而我们需要针对不同对象优化提取方案，以提高检测方法的灵敏度和准确度<sup>[19]</sup>。

### 参 考 文 献

[1] 丁俊仁,汪开毓,艾晓辉,等.不同水温下强力霉素在斑点叉

尾鲴体内的残留消除规律[J].水产学报,2009,33(4):672-678.

- [2] 安清聪,张曦,李琦华.四环素类抗生素残留的 ELISA 检测研究[J].食品科学,2005,26(6):205-207.
- [3] 丁俊仁.不同水温下强力霉素在斑点叉尾鲴体内药动学与残留规律研究[D].雅安:四川农业大学动物医学院,2010.
- [4] EL-ATY A M A,GOUDAH A,ZHOU H H.Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats [J].Pharmacological Research,2004,49(5):487-491.
- [5] 仲晓宁,张璇,巩相莲.双波长紫外分光光度法测定复方恩诺沙星可溶性粉中恩诺沙星和盐酸多西环素的含量[J].中国兽药杂志,2005,39(9):26-28.
- [6] RUZ N,ZABALA M,KRAMER M G,et al.Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography-application to particulate drug delivery systems[J].Journal of Chromatography A,2004,1031(1/2):295-301.
- [7] 赵肃清,孙远明,张春艳.甲胺磷单克隆抗体制备及鉴定[J].免疫学杂志,2003,19(2):142-145.
- [8] 甘金华,邓薇,李进平,等.强力霉素人工抗原的合成和抗体的制备[J].食品与生物技术学报,2011,30(2):316-320.
- [9] 占春霞.诺氟沙星单克隆抗体的筛选、制备及初步鉴定[D].广州:暨南大学生命科学技术学院,2007.
- [10] 李永亮,田美娜,卢曾军,等.应用活体骨髓瘤细胞制备单克隆抗体[J].中国生物工程杂志,2008,28(11):63-66.
- [11] 魏丽丽.盐酸四环素单克隆抗体的制备及其初步应用研究[D].重庆:西南大学动物科技学院,2007.
- [12] 林本夫.恩诺沙星单克隆抗体的制备、鉴定及免疫学检测方法的建立[D].长春:吉林大学畜牧兽医学院,2005.
- [13] 刘晓波,蔡美英,王霞,等.一种简单实用纯化腹水 McAb 方法——辛酸/硫酸铵法[J].华西医科大学学报,1999,30(4):455-456.
- [14] 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,2000:356-357.
- [15] 叶妮,刘智宏,金银珍,等.猪、牛、鱼组织中四环素类药物残留的测定[J].中国兽药杂志,2006,40(12):5-7.
- [16] 杨先乐,黄宣运,胡鲲,等.环丙沙星单克隆抗体的制备及鉴定[J].食品科学,2010,31(12):16-20.
- [17] 沈亚安.多西环素间接竞争 ELISA 检测方法的建立[D].武汉:华中农业大学图书馆,2010.
- [18] 乐涛.多西环素残留免疫学快速检测技术研究[D].武汉:华中农业大学图书馆,2010.
- [19] 赵银丽,王建华,王自良,等.恩诺沙星单克隆抗体的制备及 ciELISA 试剂盒的研制[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,31(2):33-39.

## Preparation of monoclonal antibody and development of ciELISA method for rapid detection of doxycycline

YU Shao-mei<sup>1,2</sup> AI Xiao-hui<sup>2</sup> GAN Jin-hua<sup>2</sup> LIU Yong-tao<sup>2</sup> SUO Wen-wen<sup>1,2</sup>

1. *College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China*

**Abstract** To detect doxycycline (DC) residues in aquatic products, a ciELISA method were developed through preparing monoclonal antibody (McAb) by immunizing BALB/C mice, using doxycycline-bovine serum albumin conjugate (DC-BSA) as immunogen. The BALB/C mice used in the experiment for cell fusion were selected by two methods, the indirect ELISA and the indirect competitive ELISA. A hybridoma cell strain (3D1-H4), which can secret a McAb that specifically reacted with DC, were obtained. The McAb was separated by using hybridoma technology, and it was identified to belong to IgG1 by the indirect ELISA. A ciELISA for detecting DC was then developed, using this McAb. This McAb was characterized on its sensitivity, IC<sub>50</sub> and veracity. The results showed that the titers of the McAb were 1 : (8×10<sup>2</sup>) and 1 : (5.12×10<sup>5</sup>) in supernatant and ascites, respectively. This McAb had 8.87%, 5.86% and 2.74% cross-reactivity with tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline, respectively. The linear detection range for this ciELISA varied from 1.58 to 199.53 ng/mL, with a sensitivity of 2.88 ng/mL and an IC<sub>50</sub> of 36.31 ng/mL. The recoveries of DC spiked in fish muscle and liver were 85.13% and 79.69%, respectively. Both the inter-assay and intra-assay coefficient variations were less than 15%. These results suggested that this ciELISA method was able to be used for detecting DC residues in aquatic products.

**Key words** doxycycline; hybridoma line; monoclonal antibody; ciELISA; aquatic products; residue detection

(责任编辑:边书京)