

## 生物检定

## 金雀异黄酮单克隆抗体的制备和间接竞争 ELISA 检测方法的建立\*

李华渊<sup>1</sup>, 国玉<sup>1</sup>, 谢伟<sup>1</sup>, 项乾<sup>1</sup>, 张文<sup>1</sup>, 曹亚婧<sup>1</sup>, 汪景<sup>2</sup>, 卢燕云<sup>3</sup>, 段思琪<sup>3</sup>, 孙颖<sup>1\*\*</sup>

(1. 武汉云克隆科技股份有限公司, 武汉 430056; 2. 武汉云克隆诊断试剂研究所有限公司, 武汉 430056;

3. 武汉优尔生检测中心有限公司, 武汉 430056)

**摘要** 目的: 制备可特异性识别金雀异黄酮(Gen)的单克隆抗体, 建立特异、快速定量 Gen 的间接竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)方法。方法: 通过曼尼希法将 Gen 和载体蛋白偶联, 合成人工抗原。免疫 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 冲击免疫后取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞, 在 50% PEG 的作用下进行细胞融合。采用有限稀释法筛选阳性亚克隆, 获取特异性单克隆抗体, 建立间接竞争 ELISA 法。结果: 试验成功筛选出 C1 和 C3 2 株抗 Gen 单克隆抗体, 效价分别为 1:32 000、1:40 000。利用 C3 抗体优化间接竞争 ELISA 反应条件, 检测抗体的灵敏度 IC<sub>50</sub> 为 16.15 ng·mL<sup>-1</sup>, 线性范围(IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>)为 3.78~55.85 ng·mL<sup>-1</sup>。交叉反应结果显示, Gen 单克隆抗体与鹰嘴豆芽素 A、尼泊尔鸢尾异黄酮的交叉反应率分别为 4.96% 和 2.40%, 而与芹菜素、4-苯并吡喃酮 2-羧酸的交叉反应率均 < 0.1%。回收率在 85%~110%, 批内和批间 RSD 均 < 10%。结论: 本研究制备了 Gen 特异性的单克隆抗体, 用其建立了 Gen 间接竞争 ELISA 检测方法, 灵敏度高, 符合免疫分析的基本要求。  
**关键词:** 金雀异黄酮; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验; 定量; 灵敏度

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)05-0859-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0492

## Preparation of genistein monoclonal antibody and establishment of indirect competitive ELISA\*

LI Hua-yuan<sup>1</sup>, GUO Yu<sup>1</sup>, XIE Wei<sup>1</sup>, XIANG Qian<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>1</sup>, CAO Ya-jing<sup>1</sup>,  
WANG Jing<sup>2</sup>, LU Yan-yun<sup>3</sup>, DUAN Si-qi<sup>3</sup>, SUN Ying<sup>1\*\*</sup>

(1. Cloud-Clone Corp, Wuhan 430056, China; 2. Wuhan Cloud-Clone Diagnostic Reagents Institute, Wuhan 430056, China;

3. USCN Life Science Inc., Wuhan 430056, China)

**Abstract Objective:** To prepare monoclonal antibodies (MAbs) that can specifically recognize genistein (Gen), and to establish a specific and rapid quantitative method for Gen using indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods:** Gen was coupled with carrier protein by the Mannich method to synthesize artificial antigens. Femal Balb/c mice aged 6~8 weeks old were immunized by Gen-BSA. After the booster immunization, splenocytes of the mice were collected and fused with SP2/0 myeloma cells under the action

\* 武汉开发区车谷英才计划(2251-4); 科技部科技型中小企业技术创新项目(11C26214202665)

\*\* 通信作者 Tel:(027)84455375; E-mail: cqo@cloud-clone.com

第一作者 Tel:(027)84259138; E-mail: mail@cloud-clone.com

of 50% polyethylene glycol (PEG). Subclones were screened by the limiting dilution method to obtain specific MAbs and an indirect competitive ELISA method was established. **Results:** Two hybridoma cell lines (C1 and C3) were isolated successfully with the titers of 1 : 32 000, 1 : 40 000, respectively. Under the optimized conditions, the indirect competitive ELISA based on C3 for Gen showed a half maximum inhibition concentration ( $IC_{50}$ ) of  $16.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  and detection ranges of  $3.78\text{--}55.85 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  with cross-reactivity for biochanin A and irisolidone of 4.96% and 2.40%, respectively, negligible cross-reactivity with other Gen analogs including apigenin and 4-oxo-4*H*-1-benzopyran-2-carboxylic acid. The recovery test showed that the recovery rate was between 85% and 110%, precision tests showed RSD of inter-assay and inter-assay was less than 10%. **Conclusion:** In this study, Gen-specific MAbs are prepared successfully. An sensitive and accurate indirect competitive ELISA based on MAb for Gen is developed. The developed method can meet the requirements for immunoassay.

**Keywords:** genistein; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; quantification; sensitivity

金雀异黄酮 (genistein, Gen) 是从豆科植物中发现的一种异黄酮, 具有和  $17\beta$ -雌二醇相似的分子结构, 可与雌激素受体结合, 发挥微弱的雌激素作用<sup>[1]</sup>。近年来, 有研究人员利用 A $\beta$ 25-35 诱导乳鼠海马神经元构建细胞损伤模型, 发现 Gen 对大鼠海马神经元损伤具有保护作用<sup>[2]</sup>。张静等<sup>[3]</sup>发现, Gen 可提高视网膜细胞抗炎和抗氧化能力, 抑制视网膜细胞凋亡, 从而起到对大鼠视网膜损伤的保护作用。Gen 的生物学活性研究逐渐成为热点, 但关于 Gen 的快速定量检测方法, 目前尚不明确。传统的仪器检测方法主要包括高效液相色谱、液质联用色谱、气相色谱等, 这些检测需要购置昂贵的仪器设备, 实验步骤烦琐, 耗时长, 成本高<sup>[4-5]</sup>。林胜军等<sup>[6]</sup>利用高效液相色谱-串联质谱法测定大豆样本中 Gen 的含量, 质量浓度在  $2.0\text{--}200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内具有良好的线性, 但需要经过柱分离、梯度洗脱和负离子电离等一系列操作, 步骤烦琐, 经济成本较高, 不适用于大量样本的快速检测。酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 基于抗原和抗体的特异性结合, 是一种成本低、高效、灵敏、快速的检测方法, 适用于大量样本的现场快速检测, 为 Gen 定量检测提供了一种新的方法。本研究利用人工抗原免疫小鼠, 制备特异性识别 Gen 的单克隆抗体, 旨在建立灵敏度高、特异性好的间接竞争 ELISA 检测方法, 为 Gen 的生物学活性及药理研究提供有效工具。

## 1 试药与仪器

卵清蛋白 (OVA) (纯度 98%, 批号 O12IS228371), 上海源叶生物科技有限公司; 牛血清白蛋白 (BSA) (纯度  $\geq 98\%$ , 批号 WXBD8494V), 购自 Sigma-Aldrich

公司; Gen、吗啉乙磺酸、鹰嘴豆芽素 A、芹菜素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 尼泊尔鸢尾异黄酮, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 无水乙醇、磷酸氢钠、磷酸二氢钾、氯化钠、氯化钾、浓硫酸、聚乙二醇 (PEG)、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF), 国药集团化学试剂有限公司; 弗氏佐剂、链球菌蛋白 G、次黄嘌呤 / 胸腺嘧啶脱氧核苷培养基添加物 (hypoxanthin/thymidin, HT)、次黄嘌呤 / 氨基蝶呤 / 胸腺嘧啶脱氧核苷培养基添加物 (hypoxanthin/aminopterin/thymidin, HAT)、4-苯并吡喃酮 2-羧酸、辣根过氧化物酶 (HRP), Sigma 公司; 单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, ThermoFisher 公司; 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB), BioFex 公司; SP2/0 骨髓瘤细胞, 美国细胞培养物收藏中心 (ATCC); 羊抗鼠 IgG, 武汉云克隆科技股份有限公司。

6 只 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心, 喂养和实验操作严格按照《实验动物管理条例》执行。本研究动物实验在武汉云克隆动物有限公司动物实验中心进行, 实验动物使用许可证号: SYXK (鄂) 2023-0135。动物实验方案符合 3R 原则, 获得武汉云克隆动物有限公司伦理审查委员会批准。

4SMR16 酶标仪 (波长范围 450~630 nm), 武汉优尔生命科学装备有限公司; UV2600 紫外分光光度计, 岛津公司; Microfuge 20 台式高速离心机, Beckman 公司; 96 孔酶标板, 购自 Corning 公司; FA604A 天平 (精度为 0.1 mg), 上海精天电子仪器有限公司; MCO-15AC 二氧化碳细胞培养箱, Panasonic 公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 偶联抗原的合成及鉴定

Gen 偶联抗原的合成采用曼尼希法<sup>[7]</sup>。BSA 偶联物制备方法如下: 向 10 mL 冻干瓶中加入 BSA 20 mg, 加入 2% 吗啉乙磺酸溶液 1 mL 溶解。称取 Gen 5 mg, 溶解于无水乙醇 0.3 mL。将 Gen 溶液加入 BSA 溶液中, 再加入 40% 甲醛溶液 50  $\mu$ L 混匀。将冻干瓶盖好且避光, 放入摇床中振荡反应 20 h, 设定温度为 25  $^{\circ}$ C。反应结束后, 取出反应液, 使用 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (PBS, 配制方法: 称取十二水合磷酸一氢钠 7.06 g、二水合磷酸二氢钠 0.52 g、氯化钠 10.5 g, 使用 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的稀盐酸调节 pH 至 7.2, 加水定容至 1 000 mL) 进行透析, 即得。OVA 偶联物制备方法如下: 向 10 mL 冻干瓶中加入 OVA 20 mg, 加入 2% 吗啉乙磺酸溶液 1 mL 溶解; 称取 Gen 5 mg, 溶解于 0.3 mL 无水乙醇; 将 Gen 溶液加入 OVA 溶液中, 再加入 40% 甲醛溶液 30  $\mu$ L 混匀, 将冻干瓶盖好且避光, 放入摇床中振荡反应 20 h, 设定温度为 25  $^{\circ}$ C, 反应结束后, 取出反应液, 使用 0.01 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PBS 进行透析, 即得。合成的抗原使用紫外光谱扫描法进行鉴定, 鉴定方法如下: 使用 1  $\times$  PBS 分别配制质量浓度为 0.5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 BSA、OVA、Gen、Gen-BSA (以 BSA 计)、Gen-OVA (以 OVA 计) 溶液, 基线调零后在 200~700 nm 波长范围内对以上 5 种溶液进行紫外光谱扫描, 记录不同波长下的吸收度, 分析数据并组合紫外光谱图, 利用组合图分析 Gen 是否与 BSA、OVA 偶联。偶联成功的紫外光谱图见图 1。

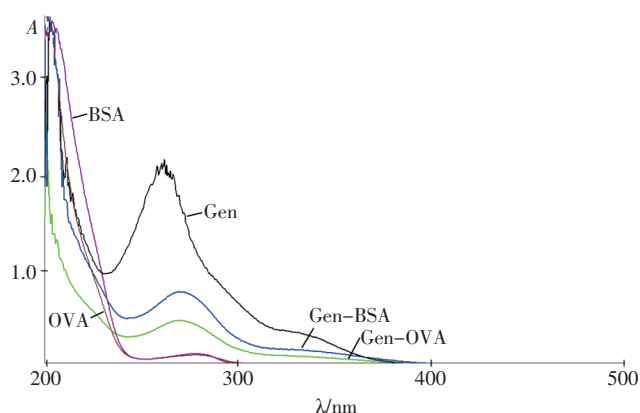


图 1 BSA、OVA、Gen、Gen-BSA、Gen-OVA 紫外光谱图  
Fig. 1 The UV-Vis absorption spectra of BSA, OVA, Gen, Gen-BSA and Gen-OVA

如图 1 所示, Gen 在 263 nm 处有特征吸收, 而 Gen-BSA 和 Gen-OVA 在 271 nm 附近出现宽吸收峰, 相对于 Gen 吸收峰有所红移, 提示 Gen 和载体蛋白成功偶联。

### 2.2 单克隆抗体的制备<sup>[8-9]</sup>

首次免疫时将 Gen-BSA 与弗氏完全佐剂按照 1:1 等体积混合。选取 4 只 6~8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠, 分别使用乳化后的抗原进行腹部多点皮下注射免疫, 21 d 后开展第 2 次免疫, 取与弗氏不完全佐剂混合后的 Gen-BSA, 对接受首次免疫的小鼠进行皮下注射免疫; 分别在第 42 天和第 63 天进行第 3、4 次腹腔免疫; 第 77 天进行冲击免疫。每只小鼠免疫剂量为 100  $\mu$ g (以 BSA 计)。取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞, 按 5:1 (数量配比) 比例, 在 50% PEG 的作用下融合, 置于选择性培养基中培养, 取细胞上清, 使用间接 ELISA 法筛选阳性杂交瘤细胞。采用有限稀释法筛选阳性亚克隆。准备 2 只 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 按照每只小鼠 0.5 mL 的剂量腹腔注射灭菌石蜡油, 7 d 后注射筛选的单克隆杂交瘤细胞株, 待小鼠腹部隆起且体积趋于稳定时采集腹水, 用蛋白 G 亲和层析法进行腹水纯化并初步检测效价。共分离 2 株单克隆抗体, 命名为 C1 和 C3。使用单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对单克隆抗体进行亚型鉴定, 鉴定结果见图 2。

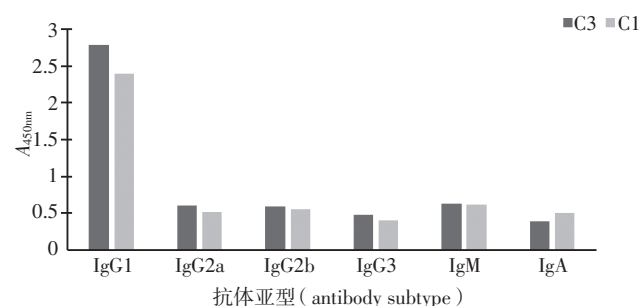


图 2 单克隆抗体 C1 和 C3 的亚型鉴定  
Fig. 2 Subtype identification of monoclonal antibody C1 and C3

本研究筛选获得 2 株稳定分泌抗 Gen 抗体的杂交瘤细胞株 (C1 和 C3)。经亚型鉴定, 2 株单克隆抗体均为 IgG1。以 4  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> Gen-OVA (以 OVA 计) 包被酶标板, 将腹水进行系列倍比稀释, 采用间接 ELISA 对腹水进行效价测定, 以 450 nm 处的吸收度为 2.0 时对应的腹水稀释度初步作为腹水的效价。C1、C3 的效价分别为 1:32 000、1:40 000, 选择 C3 作为建立间接竞争 ELISA 方法的检测抗体。

### 2.3 最佳间接竞争 ELISA 反应条件的确立

**2.3.1 方阵滴定试验** 采用方阵滴定法<sup>[10-11]</sup>初步筛选抗原包被浓度和对应的抗体稀释度的组合,具体操作如下:分别使用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 将 Gen-OVA 稀释为  $0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  6 个浓度梯度(以 OVA 计),包被酶标板,  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  孵育过夜。洗涤后加入 1% 明胶  $200 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  封闭 1 h, 每孔加入用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 倍比稀释 ( $1:4\ 000, 1:8\ 000, 1:16\ 000, 1:32\ 000,$

$1:64\ 000, 1:128\ 000, 1:256\ 000$ ) 的单克隆抗体  $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  反应 1 h 后洗涤,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG  $100 \text{ } \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  反应 40 min。洗涤后每孔加入 TMB  $100 \text{ } \mu\text{L}$ , 10 min 后加入终止液。在  $450 \text{ nm}$  波长下测定各孔吸收度,结果如表 1 所示。选择了 2 组包被浓度和抗体稀释度组合: $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, 64\ 000$  和  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}, 32\ 000$ ,这 2 个孔的吸收度在 2.0 左右,且与邻孔差异明显,是包被抗原浓度和抗体稀释度较好的组合。

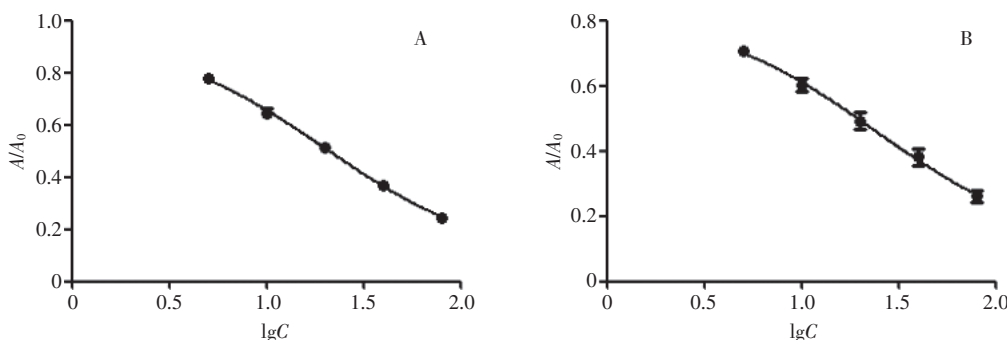
表 1 方阵滴定结果

Tab. 1 Checkerboard titration of ELISA

包被浓度 (coating concentration) / ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	吸收度 (absorbance)						
	1:4 000	1:8 000	1:16 000	1:32 000	1:64 000	1:128 000	1:256 000
4	3.392	3.314	2.81	2.453	2.264	1.482	0.643
2	3.258	3.231	2.651	2.392	<b>1.984</b>	1.143	0.492
1	2.842	2.685	2.416	<b>2.014</b>	1.617	0.875	0.365
0.5	2.143	1.892	1.652	1.246	0.712	0.557	0.228
0.25	1.126	0.861	0.692	0.415	0.304	0.233	0.194
0.125	0.724	0.621	0.549	0.341	0.286	0.185	0.164

**2.3.2 最佳抗原包被浓度的确立** 以方阵滴定法确定的抗原包被浓度和对应的抗体稀释度的组合进行间接竞争 ELISA,方法如下:分别使用  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 将 Gen-OVA 稀释为  $1, 2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (以 OVA 计),包被酶标板。明胶封闭后每孔加入倍比稀释 ( $1:32\ 000, 1:64\ 000$ ) 的单克隆抗体  $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。Gen 溶液浓度设置为  $0, 5, 10, 20, 40, 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 每孔加  $50 \text{ } \mu\text{L}$ 。  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  反应 1 h 后洗涤。显色终止后在  $450 \text{ nm}$  波长下测定各孔吸收度。绘制标准曲线(图 3),以 Gen 溶液浓度

为 0 的孔测得的  $450 \text{ nm}$  处的吸收度为  $A_0$ , 不同 Gen 溶液浓度在  $450 \text{ nm}$  处的吸收度为  $A$ , 计算抑制率为 50% 时对应的竞争物浓度,即  $\text{IC}_{50}$ 。以  $A_0$  接近 2.0、 $\text{IC}_{50}$  最低所对应的包被浓度作为抗原的最佳包被浓度。结果如下:当包被浓度为  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 抗体稀释度为  $1:32\ 000$  时,  $A_0$  为 2.116,  $\text{IC}_{50}$  为  $19.99 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 当包被浓度为  $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 抗体稀释度为  $1:64\ 000$  时,  $A_0$  为 1.895,  $\text{IC}_{50}$  为  $23.58 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。最终确立最佳包被浓度为  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 抗体稀释度初步确定为  $1:32\ 000$ 。



A. 包被浓度为  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 抗体稀释倍数为  $32\ 000$  (the coating concentration is  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the antibody dilution is  $32\ 000$ )

B. 包被浓度为  $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 稀释倍数为  $64\ 000$  (the coating concentration is  $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the antibody dilution is  $64\ 000$ )

图 3 不同包被浓度和抗体稀释度对应的标准曲线

Fig. 3 Standard curves at different concentration of Gen-OVA and different dilution ratio of antibody

**2.3.3 最佳抗体稀释度的确立** 以最佳包被浓度包被酶标板,对应的抗体稀释度为基础,等差设计 6 个

抗体稀释度,进行间接竞争 ELISA。绘制标准曲线,计算  $\text{IC}_{50}$ 。以  $A_0$  接近 2.0、 $\text{IC}_{50}$  最低时对应的抗体稀

释度作为最佳抗体稀释度,结果如图 4 所示。最终选择 1 : 36 000 为最佳抗体稀释度。

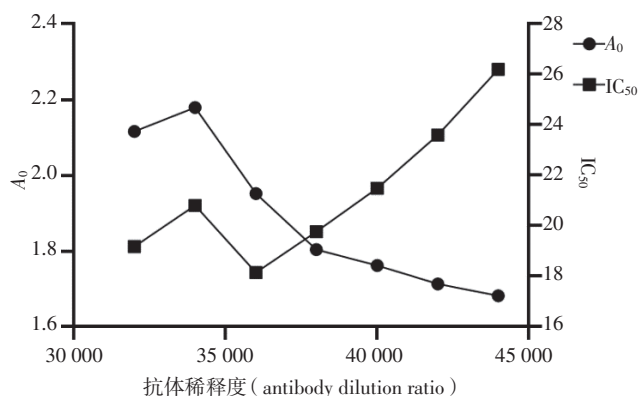


图 4 最佳抗体稀释度的确立

Fig. 4 Establishment of optimal concentration dilution for antibody

**2.3.4 间接 ELISA 反应条件优化** 使用确立的最佳包被浓度和最佳抗体稀释度,分别改变一抗孵育条件(37 °C 30 min, 37 °C 1 h),二抗孵育条件(37 °C 30 min, 37 °C 1 h)以及 TMB 显色时间(10、15 min),在 450 nm 波长下测定各孔吸收度,计算 IC<sub>50</sub>,对间接 ELISA 反应条件进行优化。选择 IC<sub>50</sub> 相对较低的一组作为优化后的试验条件:一抗孵育条件为 37 °C 30 min,二抗孵育条件为 37 °C 1 h, TMB 显色时间为 10 min,见表 2。

表 2 间接 ELISA 反应条件优化

Tab. 2 Optimization of indirect ELISA reaction conditions

因素 (factor)	反应条件 (reaction condition)	A <sub>0</sub>	IC <sub>50</sub>
一抗孵育条件(incubation condition for primary antibody)	37 °C 30 min	1.547	20.95
	37 °C 1 h	1.927	22.04
二抗孵育条件(incubation condition for secondary antibody)	37 °C 30 min	1.768	24.65
	37 °C 1 h	1.812	20.38
TMB 显色时间(TMB color development time)/min	10	1.890	19.17
	15	2.597	26.20

#### 2.4 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

根据确立的最佳抗原包被浓度和抗体稀释度,参照“2.3.2”项下试验步骤,使用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> PBS 将 Gen 制备成 0、5、10、20、40、80 ng · mL<sup>-1</sup> 6 个质量浓度的溶液,进行间接竞争 ELISA 试验。以 Gen 浓度的对数值为横坐标,各浓度对应的结合率 A/A<sub>0</sub> (A 是不同浓度 Gen 在 450 nm 处的吸收度)为纵坐标,使用 GraphPad Prism 绘制标准曲线(图 5),计算 IC<sub>50</sub>。IC<sub>50</sub> 表示灵敏度,表示 Gen 与检测抗原竞争的半抑制浓度;以 IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub> 作为线性检测范围。结果间接竞

争 ELISA 抑制曲线线性良好,IC<sub>50</sub> 为 16.15 ng · mL<sup>-1</sup>。标准曲线的线性检测范围为 3.78~55.85 ng · mL<sup>-1</sup> (IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>),检测限为 1.63 ng · mL<sup>-1</sup> (IC<sub>10</sub>)。

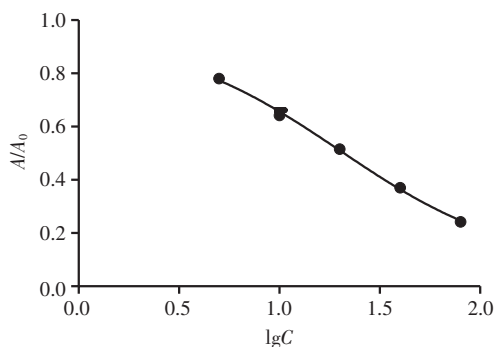


图 5 Gen 的间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 5 Establishment of standard curve for indirect competitive ELISA

#### 2.5 交叉反应分析

分别取鹰嘴豆芽素 A、尼泊尔鸢尾异黄酮、芹菜素、4-苯并吡喃酮 2-羧酸 0.5 mg,溶解于 1 mL DMF 中,制备成溶液。使用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> PBS 分别配制质量浓度为 1.0、10、100 ng · mL<sup>-1</sup> 和 1、10 μg · mL<sup>-1</sup> 的溶液,使用建立的间接竞争 ELISA 法进行检测,计算交叉反应率 (Gen 交叉反应率 =  $\frac{IC_{50}(Gen)}{IC_{50}(Gen类似物)} \times 100\%$ ),结果见表 3、图 6。

结果显示,该方法与 Gen 的反应率为 100%,对鹰嘴豆芽素 A 有弱交叉反应,其交叉反应率为 4.96%;对尼泊尔鸢尾异黄酮有弱交叉反应,其交叉反应率为 2.40%;对芹菜素、4-苯并吡喃酮 2-羧酸的交叉反应率均小于 0.1%,表明本研究建立的 Gen 间接竞争 ELISA 方法具有较高的特异性。

**2.6 回收率试验**  
取 Gen 0.5 mg 溶于 1 mL DMF,配制成溶液。使用 0.01 mol · L<sup>-1</sup> PBS 将 Gen 溶液浓度稀释成 500、50 ng · mL<sup>-1</sup>。选取 150 μL 来源于家兔的血清、血浆各 3 份,分别加入质量浓度为 50 ng · mL<sup>-1</sup> 的 Gen 溶液 17 μL,配制终浓度为 20 ng · mL<sup>-1</sup> 的加标样品;取 100 μL 血清、血浆各 3 份,分别加入质量浓度为 50 ng · mL<sup>-1</sup> 的 Gen 溶液 67 μL,配制终浓度为 20 ng · mL<sup>-1</sup> 的加标样品;取 150 μL 血清、血浆各 3 份,分别加入质量浓度为 50 ng · mL<sup>-1</sup> 的 Gen 溶液 16.7 μL,配制终浓度为 5 ng · mL<sup>-1</sup> 的加标样品。进行间接竞争 ELISA 试验,计算回收率和 RSD,结果见表 4,3 次检测的 RSD 低于 12%,血清和血浆添加 Gen 的回收率在 85%~110%,表明准确度良好。

表 3 交叉反应结果分析

Tab. 3 Cross-reactivity of anti-Gen antibody with analogues

结构类似物 (analogue)	IC <sub>50</sub> /(ng·mL <sup>-1</sup> )	交叉反应率 (cross-reactivity)/%
Gen	16.15	100
鹰嘴豆芽素 A (biochanin A)	325.62	4.96
尼泊尔鸢尾异黄酮 (irisolidone)	673.18	2.40
芹菜素 (apigenin)	—	< 0.1
4-苯并吡喃酮 2-羧酸 (4-oxo-4H-1-benzopyran-2-carboxylic acid)	—	< 0.1

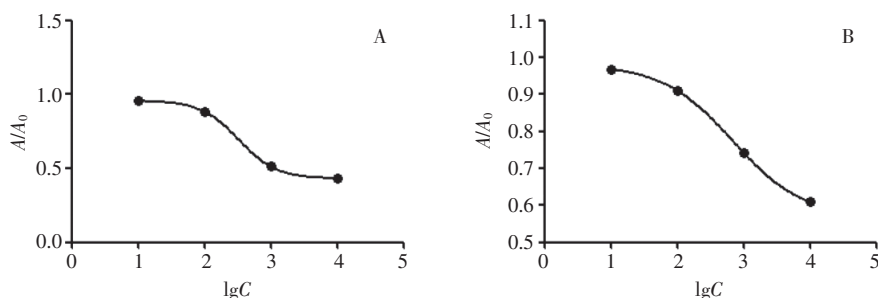


图 6 结构类似物鹰嘴豆芽素 A (A) 和尼泊尔鸢尾异黄酮 (B) 标准曲线

Fig. 6 Standard curves of analogues biochanin A(A) and irisolidone (B)

表 4 样本中 Gen 含量的回收率分析

Tab. 4 Recovery analysis of Gen spiked in serum and plasma

样品 (sample)	加标 (Gen spiked) / (ng·mL <sup>-1</sup> )	样品 1 (sample 1)	样品 2 (sample 2)	样品 3 (sample 3)	平均值 (mean value)	RSD/ %	回收率 (recovery) /%
血清 (serum)	5	4.41	4.65	4.36	4.47	3.5	89.5
	20	18.56	17.03	19.62	18.40	7.1	92.0
	50	48.73	51.69	52.91	51.11	4.2	102.2
血浆 (plasma)	5	5.25	4.89	5.17	5.10	3.7	102.1
	20	23.38	18.67	21.45	21.17	11.0	105.8
	50	46.62	49.34	47.21	47.72	3.0	95.5

## 2.7 精密度试验

**2.7.1 重复性试验** 使用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 将 Gen 配制成 5、20、50 ng·mL<sup>-1</sup> 3 种浓度的溶液,重复测定 3 次,记录并计算测定结果并测定 RSD。结果显示,当 Gen 质量浓度为 5 ng·mL<sup>-1</sup> 时,3 次测定的质量浓度分别为 4.82、5.15、4.90 ng·mL<sup>-1</sup>,平均值为 4.96 ng·mL<sup>-1</sup>,RSD 为 3.5%;当 Gen 质量浓度为 20 ng·mL<sup>-1</sup> 时,3 次测定的质量浓度分别为 21.07、20.83、21.54 ng·mL<sup>-1</sup>,平均值为 21.15 ng·mL<sup>-1</sup>,RSD 为 1.7%;当 Gen 质量浓度为 50 ng·mL<sup>-1</sup> 时,3 次测定的质量浓度分别为 52.39、49.52、51.69 ng·mL<sup>-1</sup>,平均值为 51.20 ng·mL<sup>-1</sup>,RSD 为 2.9%。同一样本重复检测的 RSD 均小于 10%,说明重复性试验结果良好。

**2.7.2 批间精密度** 使用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 将 Gen 配制成 5、20 和 50 ng·mL<sup>-1</sup> 3 种浓度的溶液,由 A、B

2 名实验人员在不同时间进行检测,每人独立测试 3 次,记录并计算测定结果。结果见表 5,不同人员在不同时间点检测样本,RSD 均不超过 10%,表明该方法的批间精密度符合要求。

## 3 讨论

Gen 是广泛存在于大豆中的黄酮类化合物,由于其结构特殊,可与雌二醇竞争结合雌激素受体后表现出双向调节作用,对于雌激素水平偏低所致的疾病,比如更年期综合征、骨质疏松等具有保护作用<sup>[12-13]</sup>。近年来,Gen 的药理作用机制受到广泛关注。多项研究表明,Gen 在机体内除了可发挥雌激素类似作用外,还在神经元损伤、细胞衰老等多个方面有重要作用<sup>[14-16]</sup>。精准定量和组织原位分析对 Gen 作用机制的研究具有十分重要的意义。

间接竞争 ELISA 是针对小分子化合物常用的分

表 5 批间精密度试验结果

Tab. 5 Results of inter-assay data

Gen 浓度 (concentration of Gen)/(ng·mL <sup>-1</sup> )	浓度 (concentration)/(ng·mL <sup>-1</sup> )						平均值 (mean value)	RSD/%
	a			b				
	试验 1 (assay 1)	试验 2 (assay 2)	试验 3 (assay 3)	试验 1 (assay 1)	试验 2 (assay 2)	试验 3 (assay 3)		
5	5.12	4.71	5.38	5.25	4.89	4.93	5.05	4.9
20	20.17	22.43	18.65	20.67	21.74	19.53	20.53	6.8
50	52.36	53.64	48.11	48.62	51.93	50.75	50.90	4.3

析方法。以特异性单克隆抗体为基础建立的免疫分析技术具有抗干扰性强和灵敏度高的特点,在当代药物分析和药理机制领域具有广泛的应用<sup>[17]</sup>。抗体的性质直接决定了所建方法的灵敏度和特异性,也是试剂盒检测效果的关键因素。Gen 为小分子半抗原,不具备免疫原性。本研究采用曼尼希法将 Gen 和 BSA 偶联,合成人工抗原,免疫小鼠,筛选单克隆抗体。利用人工抗原免疫小鼠获得了腹水效价为 1:40 000 的单克隆抗体,利用方阵滴定初步确定抗原包被浓度和抗体稀释度。为了获得更加准确的抗原包被和抗体稀释组合,进行间接竞争 ELISA 试验,计算不同条件下的 IC<sub>50</sub>,最终确定最佳包被浓度为 1 μg·mL<sup>-1</sup>,抗体稀释度确定为 1:36 000。还对间接竞争 ELISA 试验条件进行了一系列的优化,最终确定一抗、二抗及 TMB 的最佳反应时间。

本实验建立的间接竞争 ELISA 检测方法检测 IC<sub>50</sub> 为 16.15 ng·mL<sup>-1</sup>,线性检测范围为 3.78~55.85 ng·mL<sup>-1</sup> (IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub>),检测限为 1.63 ng·mL<sup>-1</sup>,说明该方法对 Gen 的检测具有较高的灵敏度。同时,为了验证其特异性,选取了鹰嘴豆芽素 A、尼泊尔鸢尾异黄酮、芹菜素等与 Gen 结构相近的类似物进行交叉反应试验,发现选用单克隆抗体除了与鹰嘴豆芽素 A、尼泊尔鸢尾异黄酮有弱交叉反应外,与其余 2 个物质的交叉反应均小于 0.1%,证实建立的检测方法特异性良好。为进一步证实该方法对 Gen 的检测效果,选取来源于家兔的血清和血浆,制备低、中、高 3 种不同 Gen 浓度的加标样品进行回收试验,回收率在 85%~110%,说明该检测方法的准确性较好。精密度试验显示批内和批间试验的 RSD 在 10% 以下,提示该方法检测 Gen 精密度良好。

#### 4 结论

本研究使用人工抗原免疫小鼠,制备特异性识别 Gen 的单克隆抗体,可为研发其他免疫学检测试剂提

供基础材料。挑选优质的单克隆抗体建立间接竞争 ELISA 检测方法,可快速、准确地对 Gen 进行定量检测,为药理机制的研究提供有效的工具,并可为多种相关疾病的研究提供助力。

#### 参考文献

- [1] 谢艳芳,游丽娟,张菊林,等.金雀异黄酮对去势大鼠分离培养的成骨细胞增殖及分化的影响[J].第三军医大学学报,2021,43(24):2671  
XIE YF, YOU LJ, ZHANG JL, *et al.* Effect of genistein on proliferation and differentiation of osteoblasts isolated and cultured from ovariectomized rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tert*, 2021, 43(24): 2671
- [2] 高华武,王艳,周鹏,等.金雀异黄酮通过调控 Ca<sup>2+</sup>-CaMKIV 通路对 Aβ<sub>25-35</sub> 诱导海马神经元损伤的保护作用[J].食品科学,2021,42(13):121  
GAO HW, WANG Y, ZHOU P, *et al.* Protective effect of genistein on Aβ<sub>25-35</sub>-induced hippocampal neuron injury by regulating Ca<sup>2+</sup>-CaMKIV pathway [J]. *Food Sci*, 2021, 42(13): 121
- [3] 张静.金雀异黄酮对大鼠视网膜缺血-再灌注损伤的保护作用[J].眼科新进展,2021,41(12):1122  
ZHANG J. Protective effect of genistein on retinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Recent Adv Ophthalmol*, 2021, 41(12): 1122
- [4] WANG L, YAN HY, YANG C L, *et al.* Synthesis of mimic molecularly imprinted ordered mesoporous silica adsorbent by thermally reversible semicovalent approach for pipette-tip solid-phase extraction-liquid chromatography fluorescence determination of estradiol in milk [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1456: 58
- [5] DUFFY E, RAMBAUD L, LE BIZEC B, *et al.* Determination of hormonal growth promoters in bovine hair: comparison of liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry methods for estradiol benzoate and nortestosterone decanoate [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 637(1-2): 165
- [6] 林胜军,丘福保,薛荣旋,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定大豆中 3 种异黄酮素[J].食品安全质量检测学报,2020,11(17):6006  
LIN SJ, QIU FB, XUE RX, *et al.* Determination for 3 kinds of isoflavones in soybean by ultra performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(17): 6006
- [7] 沈青燕. 曼尼希法合成二聚的苯并三唑类紫外吸收剂 [D]. 南京: 南京理工大学, 2010
- SHEN QY. Synthesis of Dimerized Benzotriazole UV Absorbents by Mannich Method [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2010
- [8] 白宇, 胡景炎, 许永鹏, 等. 雌二醇单克隆抗体制备及间接竞争 ELISA 检测方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 45(10): 3100
- BAI Y, HU JY, XU YP, *et al.* Preparation of monoclonal antibody and establishment of indirect competitive ELISA of estradiol [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2017, 45(10): 3100
- [9] 王长健, 骆骄阳, 秦家安, 等. 间接和直接竞争酶联免疫吸附法快速检测中药材中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的对比研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(22): 5861
- WANG CJ, LUO JY, QIN JA, *et al.* Rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in Chinese herbal medicines by indirect and direct competitive enzyme-linked immunosorbent assays: a comparative analysis [J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(22): 5861
- [10] 张煜彬, 吴忠秀, 何彬, 等. 表皮生长因子受体 III 型突变体 (EGFRv III) 单抗抗体亲和力检测的间接 ELISA 的建立及优化 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(1): 73
- ZHANG YB, WU ZX, HE B, *et al.* Establishment and optimization of an ELISA for affinity detection of single-chain antibodies to EGFRv III [J]. *J Cell Mol Immunol*, 2021, 37(1): 73
- [11] 相亚楠, 高尤, 罗龙龙, 等. 间接 ELISA 法测定猴血清中埃博拉病毒单克隆抗体 MBS77E 及药动学研究 [J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(12): 1087
- XIANG YN, GAO Y, LUO LL, *et al.* Determination of MBS77E, a monoclonal antibody against Ebola virus, in monkey serum by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the pharmacokinetic study [J]. *Chin J New Drugs*, 2021, 30(12): 1087
- [12] 韦立群, 徐成飞, 李婉婷, 等. NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号通路参与金雀异黄酮诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的体外研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(5): 690
- WEI LQ, XU CF, LI WT, *et al.* *In vitro* study of genistein inducing apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(5): 690
- [13] 陈洪燕, 汪何畏, 熊军, 等. 金雀异黄酮对去卵巢骨质疏松大鼠 OPG/RANKL/RANK 通路的影响 [J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(3): 363
- CHEN HY, WANG HW, XIONG J, *et al.* Effects of genistein tincture on OPG/RANKL/RANK pathway in ovariectomized osteoporotic rats [J]. *Northwest Pharm J*, 2019, 34(3): 363
- [14] 肖昌琼, 陈锐. 金雀异黄酮对人 CYP1A2、CYP2A6、NAT2 及 XO 酶活性的影响 [J]. *中华生物医学工程杂志*, 2022, 28(1): 54
- XIAO CQ, CHEN R. Effect of genistein on enzyme activities of CYP1A2, CYP2A6, NAT2 and XO in human [J]. *Chin J Biomed Eng*, 2022, 28(1): 54
- [15] 范勇, 洪嘉晨, 胡晶晶, 等. 金雀异黄酮对创伤后应激障碍大鼠海马组织 5-HT 水平和神经元自噬的调节作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(3): 408
- FAN Y, HONG JC, HU JJ, *et al.* Regulatory effect of genistein on 5-HT level and neuronal autophagy in hippocampus of rats with post-traumatic stress disorder [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2021, 37(3): 408
- [16] 刘亚辉, 刘思彤, 王萱, 等. 金雀异黄酮对叔丁基过氧化氢诱导的衰老 H9c2 细胞的保护作用 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(18): 113
- LIU YH, LIU ST, WANG X, *et al.* Protective effects of genistein on senescent H9c2 cells induced by tert-butyl hydrogen peroxide [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(18): 113
- [17] 朱小雨, 原梅, 罗素兰, 等. 基于夹心酶联免疫吸附方法的大鼠及比格犬血浆中海洋药物 GeXIVA 定量分析研究 [J]. *药学报*, 2021, 56(9): 2378
- ZHU XY, YUAN M, LUO SL, *et al.* Development and validation of antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method for quantitation of GeXIVA in plasma of rats and Beagle dogs [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(9): 2378

(本文于 2024 年 8 月 1 日收到)