

## 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[1,2]定量分析研究

朱小雨<sup>1,2,3</sup>, 原梅<sup>1</sup>, 罗素兰<sup>2,3</sup>, 车津晶<sup>1\*</sup>

(1. 军事医学研究院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 广西大学医学院, 广西南宁 530004;  
3. 海南大学生命科学院, 海南海口 570228)

**摘要:** GeXIVA[1,2]是利用 cDNA 克隆技术从我国南海海域的将军芋螺中鉴定的一种新型芋螺毒素,已开发成为新型镇痛药物。本研究建立并验证了大鼠及比格犬血浆中海洋药物芋螺毒素 GeXIVA[1,2]的抗体夹心酶联免疫吸附 (ELISA) 检测方法。制备鼠单克隆抗体 4B2 及生物素标记兔多克隆抗体 2#, 使用棋盘法优化抗体配对浓度、最小稀释比例、温育温度、温育时间, 建立抗体夹心 ELISA 检测方法, 并进行验证。动物实验经军事科学院军事医学研究院动物伦理与使用委员会批准 (编号: IACUC-DWZX-2020-698)。结果表明建立的 ELISA 方法在大鼠及比格犬血浆中的定量范围均在 1.25~80 ng·mL<sup>-1</sup>, 精密性、准确性、选择性、特异性、稳定性、稀释线性、钩状效应均满足生物样本分析要求。本方法可用于新型海洋药物 GeXIVA 的临床前药代动力学研究。

**关键词:** GeXIVA[1,2]; 多肽; 夹心 ELISA; 生物分析; 方法学验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)09-2378-05

## Development and validation of antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method for quantitation of GeXIVA[1,2] in plasma of rats and Beagle dogs

ZHU Xiao-yu<sup>1,2,3</sup>, YUAN Mei<sup>1</sup>, LUO Su-lan<sup>2,3</sup>, CHE Jin-jing<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China; 2. Medical College of Guangxi University, Nanning 530004, China; 3. School of Life Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** GeXIVA[1,2] is a new type of conotoxin recently discovered in the transcriptome of *Conus generalis* and it is expected to be used clinically as a new type of analgesic. This study established and verified a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay method for the marine drug GeXIVA[1,2] in the plasma of rats and Beagle dogs. The mouse monoclonal antibody 4B2 and biotin-labeled rabbit polyclonal antibody 2# were developed. The checkerboard method was used to optimize the antibody pairing concentration, minimum dilution ratio, incubation temperature, and incubation time to establish an antibody sandwich ELISA detection method. Verify the established testing methods. The established ELISA method has a quantitative range of 1.25–80 ng·mL<sup>-1</sup> in rat and Beagle plasma. The precision, accuracy, selectivity, specificity, stability, dilution linearity, and hook effect all meet the requirements for biological sample analysis. All the procedures for the animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of the Institute (Permit Number: IACUC-DWZX-2020-698). This method can support the preclinical pharmacokinetic study of the marine drug GeXIVA.

**Key words:** GeXIVA[1,2]; peptide; sandwich ELISA; bioanalysis; methodology validation

收稿日期: 2021-05-10; 修回日期: 2021-08-03.

基金项目: 海南省重大科技计划项目 (ZDKJ2016002).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66930633, E-mail: chejinjing80@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0696

疼痛是患者寻求医疗的最常见原因之一,慢性疼痛是人类痛苦和残疾的主要来源<sup>[1]</sup>。诱发慢性疼痛的因素有很多,而目前临床上治疗慢性疼痛的药物都会伴有一定的不良反应,对于疼痛的治疗效果也是很难让人满意,因此,目前迫切需要新型机制的镇痛药物来改变这一现状<sup>[2]</sup>。 $\alpha 9\alpha 10$ 型烟碱乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChRs)被认为是治疗疼痛的新型靶点<sup>[3-5]</sup>,一些特异性阻断 $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs的配体也被证明具有明确的镇痛作用<sup>[2,3,6]</sup>。

芋螺毒素 $\alpha O$ -GeXIVA是利用cDNA克隆技术从我国南海海域的将军芋螺中鉴定的一种新型芋螺毒素,由28个氨基酸组成,包含4个半胱氨酸,可通过半胱氨酸之间形成二硫键产生3种异构体。其中,GeXIVA[1,2]是迄今为止活性最强的特异性阻断 $\alpha 9\alpha 10$  nAChRs的芋螺毒素<sup>[5]</sup>。GeXIVA[1,2]在慢性压迫性神经痛(CCI)模型<sup>[7]</sup>和选择性神经损伤(SNI)模型中<sup>[5]</sup>,以及化疗药物奥沙利铂诱导的神经痛模型<sup>[8]</sup>中表现出显著镇痛活性且不成瘾。GeXIVA[1,2]具有药用潜力,有望运用于临床成为新型镇痛药。

相比于GeXIVA[1,2]已广泛开展的药效学(pharmacodynamics, PD)研究,其在药代动力学(pharmacokinetics, PK)方面的研究目前仍未很好的进行,很大程度是由于GeXIVA[1,2]血浆中稳定性差,没有合适的生物分析方法。目前未有可借鉴生物分析方法,亦无商品化抗体。本实验室开发了基于双抗体夹心ELISA的生物分析方法,灵敏度高、特异性好,能够满足临床前PK研究的需要。

## 材料与方法

**药品与主要试剂** GeXIVA[1,2]标准品(序列TCRSSGRYCRSPYDRRRRCRRITDACV, 3 451.6 Da),纯度97.67%,上海吉尔生化有限公司提供,批号:P483937-2-Y。I23A序列(序列:TCRSSGRYCRSPYDRRRRCRRATDACV, 3 410.8 Da)纯度>95%,本实验室合成。弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant, CFA, 货号F5881)、弗氏不完全佐剂(incomplete Freund's adjuvant, IFA, 货号F5506)、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA, 货号B2064-500)、酪蛋白(casein, 货号C8654)购自美国Sigma-Aldrich公司。血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH, 货号374805)购自德国Merck公司。磺基琥珀酰亚胺基-6-(生物素-酰胺基)己酸酯(sulfosuccinimidyl-6-(biotin-amido) hexanoate, sulfo-NHS-LC-Biotin, 货号21335)购自美国Thermo公司。AD11.10及AD11.15购自京天成生物技术有限公司。金葡菌A蛋白(staphylococcal protein A, Protein A, 货号

L00210)及链球菌G族的细胞表面蛋白(streptococcal protein G, Protein G)柱料(货号L00209)购自南京金斯瑞生物科技有限公司。含Tween 20的磷酸盐缓冲溶液(phosphate-buffered saline with Tween 20, PBST 货号P1031)、包被液(货号C1055)、终止液(货号C1058)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)单组分显色液(货号PR1200)、购自北京索莱宝。酶标板(货号42592)购自美国Corning公司,蛋白酶抑制剂cOmplete(货号4693116001)购自瑞士Roche公司,链霉亲和素-HRP(SA-HRP, 货号016-030-084)购自美国Jackson ImmunoResearch公司。

**实验动物** 比格犬及空白血浆购于北京新星科技有限公司,生产许可:SCXK(京)2016-004。SD大鼠、Balb/C小鼠购于维通利华,生产许可证SCXK(京)2016-0006。动物实验经军事科学院军事医学研究院动物伦理与使用委员会批准,且实验均按照相关指导原则和规定进行,伦理编号IACUC-DWZX-2020-698。

**主要仪器** M190酶标仪(美国Molecular Device公司),Wallwash洗板机(美国Thermo公司),ST60-4恒温摇床(杭州米欧仪器)。

**GeXIVA 抗体制备** 将GeXIVA[1,2]与KLH偶联后分别与CFA和AD11.15混合,用于免疫Balb/C小鼠制备单克隆抗体;将GeXIVA[1,2]与KLH偶联后分别与佐剂CFA和AD11.10混合,以免疫新西兰白兔制备多克隆抗体。使用间接法评价尾血价效,挑选尾血价效最高的小鼠和兔。取小鼠脾脏细胞与骨髓杂交瘤细胞SP2/0融合并用间接法筛选出最强阳性克隆。将阳性克隆注射入预先注射了IFA佐剂的小鼠的腹腔,获得腹水。通过Protein G填料柱纯化小鼠腹水及Protein A填料柱纯化兔血清,获得小鼠单克隆抗体4B2以及兔多克隆抗体2#。取2#多克隆抗体使用PBS溶液4℃透析过夜,加入Sulfo-NHS-LC-Biotin,反应1h后,使用脱盐柱进行纯化。根据OD280的读数计算生物素标记抗体的浓度,加入20%的甘油后-20℃保存备用。

**ELISA 检测方法开发** 通过棋盘法优化配对抗体浓度<sup>[9]</sup>。分别将20、10、5和2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  4B2鼠单抗及2、1、0.5和0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  2#生物素兔多抗以及1:5、1:10、1:40最小稀释比例,交叉配对,筛选出最优抗体配对比例及最小稀释比例。以空白基质的吸光度(optical density, OD)值与标准曲线的线性范围作为确定最佳反应条件的标准,既要检测下限满足实际样品检测,也要使线性范围足够宽,才具有实际应用的意义。在优选方法上再进一步优化了孵育温度及时长。经优化的洗液为PBST,封闭液为含0.5% Casein的PBS溶液,样品稀释液为含3% BSA的PBST溶液。优化的ELISA

法为: 使用包被液将4B2单抗稀释至 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 加入至96孔酶标板中, 每孔 $100\ \mu\text{L}$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ 包被过夜; 使用封闭液每孔加入 $200\ \mu\text{L}$ ,  $37\ ^\circ\text{C}$ 封闭1.5 h; 所有实测样品、标准曲线样品、质控样品均设置复孔; 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 样品并于摇床中 $25\ ^\circ\text{C}$ ,  $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温育1 h; 每孔加入 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  2#生物素抗体 $100\ \mu\text{L}$ ,  $25\ ^\circ\text{C}$   $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温育1 h; 每孔加入10 000倍稀释的SA-HRP,  $25\ ^\circ\text{C}$   $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 温育1 h; 每孔加入TMB单组份显色液 $100\ \mu\text{L}$ ,  $25\ ^\circ\text{C}$ 避光反应10 min; 每孔加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ 终止反应。在检测波长 $450\ \text{nm}$ 和参比波长 $630\ \text{nm}$ 下通过Softmax Pro 7.0.3 (美国Molecular Device公司) 读取吸光度值, 并使用该软件通过Logistic四参数拟合 $[y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)]$ 获得标准曲线以及进行未知样品的计算, 其中 $y$ 为响应值,  $x$ 为分析物浓度,  $A_1$ 为零分析物浓度响应值,  $A_2$ 为最高浓度响应值,  $x_0$ 为 $\text{EC}_{50}$ 浓度,  $p$ 为斜率参数。

**GeXIVA[1,2]储备液制备** 精密称取GeXIVA[1,2]冻干粉末溶于纯净水中, 配制 $2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GeXIVA[1,2]储备液,  $4\ ^\circ\text{C}$ 放置备用。

**血浆样品配制** 取1片cOmplete蛋白酶抑制剂溶于 $2\ \text{mL}$ 纯净水制得25倍蛋白酶抑制剂储备液。取样品稀释液 $9\ \text{mL}$ 加入空白血浆 $1\ \text{mL}$ 及25倍蛋白酶抑制剂 $400\ \mu\text{L}$ , 配制含蛋白酶抑制剂及血浆的样品稀释液。取 $495\ \mu\text{L}$ 上述含血浆及蛋白酶抑制剂的样品稀释液, 加入 $2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  GeXIVA[1,2]储备液 $5\ \mu\text{L}$ , 即含GeXIVA[1,2] $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆经样品稀释液10倍稀释后的样品。继续使用含血浆及蛋白酶抑制剂的样品稀释液稀释该样品, 制备所有验证项中的标准曲线及质控 (quality control, QC) 的样品。

#### 方法学验证

**标准曲线** 标准曲线样品点浓度分别为1.25、2.5、5、10、20、40和 $80\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。标准曲线配制方法见“血浆样品配制”项, 进行独立的6个不同批次进行, 接受标准为至少75%的校正标样的回算浓度在标示值的相对误差 (relative error, RE) 的 $\pm 20\%$ 之内; 定量上限 (upper limit of quantification, ULOQ) 和定量下限 (lower limit of quantity, LLOQ) 为25%。

**精密度和准确度** 6个分析批, 每个分析批包含5套验证样品, 每套验证QC包含5个浓度 (ULOQ 80、HQC 60、MQC 30、LQC 3和LLOQ  $1.25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。方法的精密度用相对标准偏差 (RSD) 表示, 方法的准确度用RE表示。接受标准为: 精密度 $\leq 20\%$  (LLOQ和ULOQ $\leq 25\%$ ), 准确度范围:  $\leq \pm 20\%$  (LLOQ和ULOQ:  $\pm 25\%$ ), 批间总误差 $\leq 30\%$  (LLOQ和ULOQ $\leq 40\%$ )。

**选择性** 考察10份个体血浆, 每份考察3个水平的

样品, 空白、ULOQ ( $80\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和LLOQ ( $1.25\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。接受标准为: 要求至少80%的样品准确度在 $\pm 25\%$ 范围内, 且未加入GeXIVA[1,2]的血浆的测量值应低于LLOQ。

**稳定性** 使用大鼠及比格犬血浆配制LQC ( $3\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、HQC ( $60\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )两个浓度的QC样品, 并迅速加到含有蛋白酶抑制剂的样品稀释液中, 每个浓度样品3个重复, 考察了室温及 $4\ ^\circ\text{C}$ 、1 h稳定性。接受标准为每一浓度质控样品应有67%以上的样品浓度在标示值的 $\pm 20\%$ 范围内 ( $\text{RE} \leq \pm 20\%$ )且 $\text{RSD} \leq 20\%$ 。

**特异性** I23A为GeXIVA[1,2]第23位氨基酸突变体。考察了干扰物质I23A对检测的影响。配制大鼠及比格犬血浆中的LQC ( $3\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、HQC ( $60\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )两个浓度的QC样品, 及空白基质组。向空白、LQC及HQC样品中加入1倍及10倍ULOQ量的干扰物I23A ( $80$ 及 $800\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 每个浓度样品3个重复。要求至少80%的质控样品准确度在 $\pm 20\%$ 范围内, 且未加入分析物的基质的测量值应低于定量下限。

**稀释线性** 考察了5、10倍稀释因子。每个稀释倍数验证样品3个重复。 $200\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品用于1:5、1:10稀释, 验证浓度分别为 $40$ 、 $20\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。接受标准为: 样品测定浓度准确度在 $\pm 20\%$ 范围内,  $\text{RSD} \leq 20\%$ 。

**钩状效应** 考察了100、200、2 000和20 000  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度样品, 观察高浓度样品吸光度值, 判断是否有钩状效应的发生。

## 结果

### 1 大鼠血浆中GeXIVA[1,2]检测方法学验证结果

**1.1 线性范围及定量下限** 标准曲线通过Logistic四参数方程 $y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$ 拟合; 典型的标准曲线参数为 $A_1 = 0.188 \pm 0.027$ ,  $A_2 = 3.700 \pm 0.082$ ,  $x_0 = 16.900 \pm 0.765$ ,  $p = 1.384 \pm 0.067$ 。标准曲线在 $1.25 \sim 80\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 各浓度点复孔之间重现性好, 大鼠血浆中标准曲线样品检测精密度RSD范围为 $1.61\% \sim 5.61\%$ , 准确度RE范围为 $-2.33\% \sim 2.23\%$ , 验证样品满足接受标准。

**1.2 准确度和精密度** 结果如表1所示。方法批内精密度范围为 $3.11\% \sim 9.70\%$ , 批内准确度范围为 $-7.52\% \sim 1.36\%$ ; 批间精密度范围为 $2.07\% \sim 6.45\%$ , 批间准确度范围为 $-10.43\% \sim 2.46\%$ , 批间总误差范围为 $4.90\% \sim 16.7\%$ 。验证样品准确度和精密度满足接受标准。

**1.3 选择性** 验证结果表明10个大鼠个体空白血浆药物检测浓度均低于LLOQ, 全部LLOQ检测浓度RSD在 $3.21\% \sim 18.27\%$ , RE在 $-3.14\% \sim 18.49\%$ 之间; 9个ULOQ检测浓度RSD在 $2.57\% \sim 12.61\%$ , RE在 $-20.18\% \sim$

**Table 1** Accuracy and precision of GeXIVA[1,2] in rat plasma

Level /ng·mL <sup>-1</sup>	Intra-run		Inter-run		Total error
	RE	RSD	RE	RSD	
80	-7.52%	7.58%	-8.92%	2.07%	10.99%
60	-3.19%	9.70%	-3.53%	6.45%	9.98%
30	1.36%	4.32%	2.46%	2.44%	4.90%
3	-3.30%	3.11%	-4.30%	2.79%	7.10%
1.25	-7.34%	6.92%	-10.43%	6.27%	16.70%

20.28% 之间。结果显示样品选择性满足接受标准。

**1.4 稳定性** 结果表明LQC、HQC样品在4℃及常温1 h内浓度的RSD在-7.26%~15.89%, RE在-13.83%~-4.87%之间,表明样品在上述条件下稳定。

**1.5 特异性** 结果显示,空白组检出浓度均低于LLOQ; LQC、HQC样品RE在-15.82%~9.11%之间, RSD在2.51%~10.32%之间,结果表明特异性满足接受标准。

**1.6 稀释线性** 结果表明,验证5倍及10倍稀释因子检测浓度的RSD分别为10.31%和10.01%; RE分别为-10.53%和3.88%,结果表明稀释线性满足接受标准。

**1.7 钩状效应** 结果显示,100、200、2 000和20 000 ng·mL<sup>-1</sup>检测平均OD值分别为: 2.87 ± 0.05、2.96 ± 0.16、3.10 ± 0.06、3.20 ± 0.03。提示在100~20 000 ng·mL<sup>-1</sup>浓度内无钩状效应。

## 2 比格犬血浆中GeXIVA[1,2]检测方法学验证结果

**2.1 线性范围及定量下限** 标准曲线通过Logistic四参数方程 $y = A_2 + (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p)$ 拟合; 典型的标准曲线参数为 $A_1 = 0.098 \pm 0.013$ ,  $A_2 = 3.300 \pm 0.048$ ,  $x_0 = 20.046 \pm 0.562$ ,  $p = 1.371 \pm 0.038$ 。结果表明,标准曲线在1.25~80 ng·mL<sup>-1</sup>内,各浓度点复孔之间重现性好。比格犬血浆中标准曲线样品检测精密度RSD在1.95%~11.02%之间; 准确度RE为-6.82%~4.32%。验证样品满足接受标准。

**2.2 准确度和精密度** 结果如表2所示。比格犬血浆中批内精密度范围为3.54%~18.86%,批内准确度范围为-17.60%~16.03%; 批间精密度范围为5.37%~10.20%,批间准确度范围为-14.92%~7.16%,批间总误差范围为11.82%~20.30%。验证样品精密度和准确度满足验证接受标准。

**2.3 选择性** 结果表明10个比格犬空白个体血浆测

**Table 2** Accuracy and precision of GeXIVA[1,2] in dog plasma

Level /ng·mL <sup>-1</sup>	Intra-run		Inter-run		Total error
	RE	RSD	RE	RSD	
80	-17.60%	18.86%	-14.92%	4.57%	19.50%
60	16.03%	9.01%	1.62%	10.37%	11.98%
30	1.18%	3.54%	7.16%	7.13%	14.29%
3	-2.73%	8.39%	-8.75%	8.32%	17.07%
1.25	4.37%	18.20%	-7.82%	6.78%	14.61%

定药物浓度均低于LLOQ; LLOQ水平样品检测RSD在2.56%~11.90%, RE在-20.36%~-4.6%之间; 8个ULOQ水平样品检测RSD在3.57%~22.25%, RE在-8.78%~17.19%之间,结果表明选择性满足接受标准。

**2.4 稳定性** 结果表明在这些样品测定RSD在4.37%~15.89%, RE在-13.83%~-4.87%之间,提示样品在这些条件下是稳定的。

**2.5 特异性** 结果显示,加入了80及800 ng·mL<sup>-1</sup>两个浓度I23A的空白血浆样品实测浓度低于LLOQ; LQC、HQC样品RSD在1.93%~11.46%之间, RE在-15.77%~5.03%之间,特异性满足接受标准。

**2.6 稀释线性** 在比格犬血浆中5倍及10倍稀释因子验证样品的RSD分别为5.72%、5.68%, RE分别为-9.35%、-9.56%。稀释线性验证样品满足接受标准。

**2.7 钩状效应** 验证结果显示,100、200、2 000和20 000 ng·mL<sup>-1</sup>检测平均吸光度分别为: 2.62 ± 0.05、2.69 ± 0.12、2.92 ± 0.14和3.08 ± 0.04。提示在100~20 000 ng·mL<sup>-1</sup>浓度内无钩状效应。

## 讨论

GeXIVA[1,2]是目前极具成药潜力的具有镇痛活性的海洋来源的多肽。由于结构复杂、稳定性差、易降解、用药量少而生物基质中干扰物多等原因,开发合适GeXIVA[1,2]的生物分析方法存在着较大的难度。主流分析方法各有利弊,ELISA由于特异性好,灵敏度高,目前正被广泛的运用于肽类及蛋白类样品的分析<sup>[10]</sup>。但是多肽分子量较小,免疫原性弱,因此制备高亲和力的单克隆抗体较为困难,开发可配对的抗体对的难度也较大。在本实验中,由于产生单克隆抗体所使用的细胞为SP/0杂交瘤细胞,因此选用同种属的BALB/C小鼠作为免疫源<sup>[11]</sup>。鼠单抗杂交瘤技术比较成熟,单克隆抗体多采用小鼠来源,即传统的杂交瘤技术筛选。多克隆抗体多采用兔来源,即采集兔多抗血清,提取纯化多克隆抗体。相比其他多抗用动物种属如猴,兔相对成本较低,而相对小鼠和大鼠,兔可收集更多血清量<sup>[12]</sup>。本研究中,在获得了特异性的抗体对之后经过优化最终建立了ELISA检测方法。

GeXIVA[1,2]在人血清中降解快、半衰期短<sup>[13]</sup>,在大鼠及比格犬血浆中这种现象同样存在,这对于建立及验证检测方法以及后续实际样品的检测都是不小的挑战。据文献报道及本实验室前期经验<sup>[14]</sup>,加入蛋白酶抑制剂是首先考虑到的使多肽在基质样品中稳定的方法。为了获得更好的对蛋白酶的抑制作用,选择使用含有EDTA版本的cOmplete抑制剂。由于EDTA会影响全血的凝固,因此使用血浆而不是血清作为检测基

质。在本实验室前期的工作中,使用LC-MS/MS方法验证过含终浓度为2倍工作浓度的蛋白酶抑制剂的样品相对于含1倍工作浓度蛋白酶抑制剂的样品稳定性无显著变化。因此在本研究最终仅使用1倍工作浓度作为最终的抑制剂浓度。在血浆中加入蛋白酶抑制剂后,GeXIVA[1,2]的降解速度减缓,但常温及4 °C血浆稳定性仍不能通过稳定性考察的标准。在将含有GeXIVA[1,2]的血浆样品以10倍稀释并按比例加入蛋白酶抑制剂后,GeXIVA[1,2]可以保持在常温及4 °C下于1 h内稳定,并保证了方法的定量下限在 $1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。同时标准曲线及QC的配制均先将血浆及蛋白酶抑制剂加至样品稀释液后,再将GeXIVA[1,2]母液加至上述稀释液,尽可能地保持样品的稳定。

本文所报道的自主建立的基于双抗体夹心ELISA的检测GeXIVA[1,2]在大鼠及比格犬血浆中浓度的定量分析方法,其验证均参照《中国药典》第四版附录9012生物样品定量分析方法验证指导原则中的配体结合分析项进行并全部满足要求。本方法可以用于比格犬及大鼠给药血浆样品中GeXIVA[1,2]浓度的检测。由于临床前数据用于注册申报,暂时没有提供动物数据。本研究不仅为GeXIVA[1,2]提供了灵敏的生物检测方法,也为GeXIVA[1,2]后续的临床试验样品分析提供了可靠的技术支持。

**作者贡献:** 朱小雨负责方法学验证、动物实验、文献的调研整理以及初稿的撰写。原梅老师、罗素兰教授负责实验设计。本文通讯作者车津晶研究员负责实验设计、稿件修改等工作。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Treede RD, Rief W, Barke A, et al. Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11) [J]. *Pain*, 2019, 160: 19-27.
- [2] Mcintosh JM, Absalom N, Chebib M, et al. Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain [J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78: 693-702.
- [3] Romero HK, Christensen SB, Di Cesare Mannelli L, et al. Inhibition of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: E1825-E1832.
- [4] Hone AJ, Servent D, Mcintosh JM.  $\alpha$ 9-containing nicotinic acetylcholine receptors and the modulation of pain [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175: 1915-1927.
- [5] Luo S, Zhangsun D, Harvey PJ, et al. Cloning, synthesis, and characterization of  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA, a potent  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: E4026-E4035.
- [6] Di Cesare Mannelli L, Cinci L, Micheli L, et al. alpha-conotoxin RgIA protects against the development of nerve injury-induced chronic pain and prevents both neuronal and glial derangement [J]. *Pain*, 2014, 155: 1986-1995.
- [7] Li X, Hu Y, Wu Y, et al. Anti-hypersensitive effect of intramuscular administration of alphaO-conotoxin GeXIVA[1,2] and GeXIVA[1,4] in rats of neuropathic pain [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, 66: 112-119.
- [8] Wang H, Li X, Zhangsun D, et al. The  $\alpha$ 9 $\alpha$ 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA[1,2] alleviates and reverses chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. *Mar Drugs*, 2019, 17: 265.
- [9] Zhang Y, Xu G, Zhang L, et al. Development of a double monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting canine distemper virus [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104: 10725-10735.
- [10] Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA [J]. *Peptides*, 2015, 72: 4-15.
- [11] Johnson DR. Murine Monoclonal Antibody Development [M] // Paul S, editor. *Antibody Engineering Protocols*, Totowa, NJ: Humana Press, 1995: 123-137.
- [12] Cooper HM, Patterson Y. Production of Polyclonal Antisera [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2008, 82: 2.4.1-2.4.10.
- [13] Yu S, Wu Y, Xu P, et al. Effects of serum, enzyme, thiol, and forced degradation on the stabilities of  $\alpha$ O-conotoxin GeXIVA [1,2] and GeXIVA [1,4] [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2018, 91: 1030-1041.
- [14] Che J, Meng Q, Chen Z, et al. Quantitative analysis of a novel HIV fusion inhibitor (sifuvirtide) in HIV infected human plasma using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51: 927-933.