

• 药剂与工艺 •

紫柳素人工抗原的合成与鉴定

万凤^{1,4}, 孔慧^{1,4*}, 屈会化^{2,4*}, 张越^{1,4}, 冯会宾^{3,4}, 赵琰^{1,4*}, 王庆国^{1,4}

1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029
2. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102
4. 北京中医药大学“经典方剂的应用基础研究”创新团队, 北京 100029

摘要: 目的 人工合成紫柳素(butin)的完全抗原并进行鉴定。方法 采用氯乙酸钠(SMCA)与紫柳素中的羟基反应形成羧甲基醚衍生物(紫柳素-SMCA), 再通过羧基与载体蛋白(BSA、OVA)偶联形成完全抗原, 以TLC法鉴别是否偶联产生新的大分子化合物, 并以紫外扫描分析完全抗原的偶联比率, 将得到的免疫原紫柳素-BSA按免疫程序免疫Balb/c小鼠。结果 TLC显示已经形成新的大分子化合物; 紫外扫描法测定紫柳素-BSA的偶联比为6:1, 紫柳素-OVA的偶联比为5:1。采用间接酶联免疫测定, 产生的抗血清的稀释度可以达到1:4 000。结论 经过TLC法、紫外扫描法和免疫方法鉴定, 成功合成了紫柳素人工抗原。

关键词: 紫柳素; 人工抗原; 氯乙酸钠; 酶联免疫分析法; TLC

中图分类号: R284.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0337-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.008

Synthesis and identification of butin artificial antigen

WAN Feng^{1,4}, KONG Hui^{1,4}, QU Hui-hua^{2,4}, ZHANG Yue^{1,4}, FENG Hui-bin^{3,4}, ZHAO Yan^{1,4},
WANG Qing-guo^{1,4}

1. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
4. "Classical Prescription Application Foundation Research" Innovation Team, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To synthesize artificially and identify the complete antigen of butin. **Methods** Butin was reacted with sodium chloroacetate (SMCA) to form butin-SMCA, and then coupled respectively to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to form complete antigen. The TLC method was used for the identification of new large molecular compound. The coupling ratio was determined by ultraviolet spectrometry and the antigenicity was examined using animal immune method. **Results** New macromolecular compound was detected by TCL method. The coupling ratio of butin-BSA was 6:1 and that of butin-OVA was 5:1. The indirect enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) showed that the butin artificial antigen had the production of specific antibody with the titer as 1:4 000. **Conclusion** This method could synthesize butin artificial antigen successfully and produce the antibody to butin in the serum of immunized mice.

Key words: butin; artificial antigen; sodium chloroacetate; enzyme linked immuno sorbent assay; TLC

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373542, 81274043); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(201318101)

作者简介: 万凤(1988—), 女, 硕士研究生。Tel: (010)64286705 E-mail: wanfeng_kitty@163.com

*通信作者 孔慧 Tel: (010)64286705 E-mail: doris7629@126.com

屈会化 Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihuar@gmail.com

赵琰 Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@gmail.com

驱虫斑鸠菊 *Ver-nohia anthelmintica* (L.) Willd 系菊科斑鸠菊属植物, 其成熟果实具有清除异常黏液质、驱虫、消肿、散寒、止痛的作用, 用于治疗白癜风、湿寒性胃痛、肝病等^[1], 是疗效显著的代表性维药之一, 曾有报道以紫柳素作为驱虫斑鸠菊质量控制的指标性成分^[2]。临床上用驱虫斑鸠菊的多种制剂治疗白癜风, 疗效确切^[3-6], 皮肤用药作用机制研究的关键是解析其在皮肤中的分布, 传统的 HPLC 方法难以达到痕量成分的检测, 而基于特异性抗体的免疫分析技术^[7], 具有灵敏度高 (检测限可达 1 pg~1 μg)、特异性强、检测样品用量少、前处理简单等诸多优势, 特别适合生物样品的快速灵敏检测。为制备出紫柳素单克隆抗体以建立其酶联免疫分析 (ELISA) 法, 首先需要合成紫柳素的人工抗原和免疫原。

紫柳素是一种黄酮苷元, 水溶性比较差, 其人工抗原的合成非常困难。另外, 其结构中无糖基, 无法用常规的高碘酸钠氧化法和碳二亚胺法进行直接合成。本研究采用氯乙酸钠 (SMCA) 法先在其羟基上连接羧基, 然后再用碳二亚胺法进行合成, 得到了紫柳素的人工抗原。

1 材料

雄性 Balb/c 小鼠 5 只, 体质量 18~20 g, 维通利华实验动物中心提供, 动物使用许可证号 SCXK (京) 2012-0001。

紫柳素 (butin, 南通飞宇生物科技有限公司); 牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA)、马血清、弗氏完全佐剂 (F5881)、弗氏不完全佐剂 (F5506), Sigma 公司; 氯乙酸钠 (SMCA, 北京化学试剂厂); 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二酰亚胺盐酸盐 (碳二亚胺, Alfa Aesar 公司); 酶标二抗 (HRP 标记羊抗鼠 IgG, Gene-Script 公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4, 0.05 mol/L); 碳酸盐缓冲液 (CBS, pH 9.4, 0.05 mol/L), 洗涤缓冲液 (PBST, pH 7.4), 稀释液 (含 1% BSA), 终止液 (2 mmol/L H₂SO₄), 底物缓冲液 (pH 5.0 磷酸柠檬酸)。96 孔酶标板 (Corning 公司), CECIL 7200 型紫外-可见分光光度计 (英国 Cecil Instruments 公司), Tecan Safire2 全波长多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)。

2 方法与结果

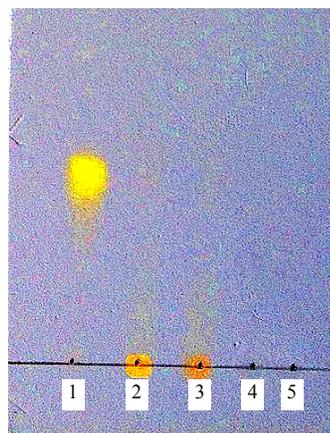
2.1 紫柳素完全抗原的合成^[8-9]

取氯乙酸钠和碳酸钠溶于 2 mL 水中, 得到 A 液; 取紫柳素加 95% 乙醇溶解, 得到 B 液; 将 A

液缓慢滴入 B 液中, 室温磁力搅拌 12 h, 得 C 液。分别取 C 液上清 1 mL 2 份, 置 80 °C 水浴蒸干, 然后分别用 1 mL 的 CBS 溶液溶解, 加适量碳二亚胺室温搅拌反应 24 h, 在冰浴下分别加入 BSA (10 mg/mL) 和 OVA (10 mg/mL) 的 CBS 溶液 1 mL, 室温搅拌 12 h, 即得分别含有免疫抗原紫柳素-BSA 和包被抗原紫柳素-OVA 的溶液。4 °C 冰箱保存待测。

2.2 紫柳素完全抗原的鉴定

2.2.1 TLC 鉴别^[10] 取免疫抗原紫柳素-BSA 和包被抗原紫柳素-OVA 溶液作为供试品溶液。取紫柳素加甲醇溶解制成 0.1 mg/mL 的溶液, 作为对照溶液; 分别取 BSA 和 OVA 干粉加 CBS 溶液制成 1 mg/mL 的溶液, 作为阴性对照溶液。照 TLC 法试验, 吸取上述供试品溶液各 1 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以甲苯-醋酸乙酯-甲酸 (5:4:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 氨熏至斑点清晰。在 TLC 中, 紫柳素对照溶液显黄色斑点, 紫柳素-BSA 和紫柳素-OVA 供试品溶液在点未展开呈黄色斑点, 而 BSA 和 OVA 的溶液在点未见明显斑点, 说明紫柳素的完全免疫抗原和包被抗原已合成成功, 结果见图 1。



1-紫柳素 2-紫柳素-BSA 3-紫柳素-OVA 4-BSA 5-OVA
1-butin 2-butin-BSA 3-butin-OVA 4-BSA 5-OVA

图 1 紫柳素人工抗原 TLC 鉴别

Fig. 1 TLC results of butin artificial antigens

2.2.2 紫外扫描鉴别 先用 CBS 精确配制适宜浓度的紫柳素与 BSA 标准溶液, 然后将待检样品按 1:1 000 稀释后, 用紫外分光光度计测出紫柳素、BSA、紫柳素-BSA 的全波长图谱及最大吸收波长处的吸光度 (A) 值, 计算紫柳素-BSA 的偶联比。同法计算紫柳素-OVA 的偶联比。

由紫外扫描结果可以看出, BSA 在 CBS 溶液中于 278.8 nm 有最大特征吸收, 紫柳素在 CBS 溶液中分别于 253.0、306.7、335.2 nm 处出现最大特征吸收波长, 而紫柳素-BSA 的最大特征吸收波长出现在 269.2 nm, 结合物的紫外光谱明显具有紫柳素和 BSA 蛋白叠加的特征, 并且相同质量浓度的结合物和标准蛋白的紫外光谱相比较, *A* 值明显增高。经计算紫柳素-BSA 的偶合比为 6 : 1, 符合文献推荐的理想范围 (5 : 1~20 : 1) [11]。结果见图 2。

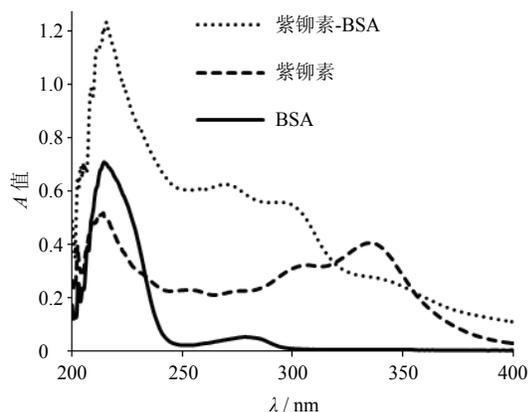


图 2 BSA、紫柳素和紫柳素-BSA 的 UV 全波长扫描图
Fig. 2 Full wavelength UV scanning of BSA, butin, and butin-BSA

加入紫柳素与 OVA 的 CBS 紫外扫描结果, OVA 在 CBS 溶液中于 280.9 nm 有最大特征吸收, 紫柳素在 CBS 溶液中分别于 253.0、306.7、335.2 nm 处出现最大特征吸收波长, 而紫柳素-BSA 的最大特征吸收波长出现在 270.4 nm, 偶联物紫柳素-OVA 紫外吸收光谱图, 兼具有载体蛋白和半抗原的特征, 表明半抗原与 OVA 已经偶联, 形成了复合物紫柳素-OVA。经计算紫柳素-OVA 的偶合比为 7 : 1。结果见图 3。

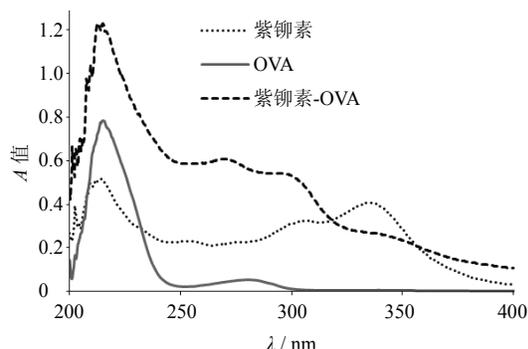


图 3 OVA、紫柳素、紫柳素-OVA 的 UV 全波长扫描图
Fig. 3 Full wavelength UV scanning of OVA, butin, and butin-OVA

2.2.3 ELISA 检测方法

(1) 动物免疫实验: 采用本实验室常规免疫方法 [12-14], 用紫柳素-BSA 免疫原经背部 sc 免疫小鼠。首次免疫采用弗氏完全佐剂与免疫原经乳化后的乳剂, 免疫剂量 100 μL/只。以后每隔 2 周加强免疫 1 次, 改用弗氏不完全佐剂乳化抗原, 免疫剂量相同。从第 4 次免疫起, 每次免疫后 1 周断尾末端取血, 分离血清。

(2) 抗体效价测定 [15]: 用紫柳素-OVA 作包被原, 采用间接 ELISA 测定抗血清的效价。包被抗原以 CBS 包被缓冲液稀释至质量浓度为 1.25 mg/L, 每孔加 100 μL 后 37 °C 包被 2 h。以 PBST 洗板, 每次 3 min, 共 3 次, 拍干。每孔加马血清 10% 封闭液 250 μL, 37 °C 封闭 1 h, 洗板 3 次, 37 °C 烘干。每孔分别加样 100 μL, 抗血清的初始稀释倍数为 500 倍, 以 2 倍为稀释梯度逐级稀释。以空白对照组小鼠血清作为阴性对照。37 °C 反应 1 h, 洗板 3 次, 再于每孔加入 HRP-羊抗鼠二抗 (1 : 10 000) 100 μL, 37 °C 反应 1 h。洗板 3 次, 每孔加入 TMB 显色液 100 μL, 37 °C 显色 15 min, 每孔加 2 mmol/L 硫酸 50 μL 终止反应。测定 *A*₄₅₀ 值。根据试剂盒操作常规, 抗血清终点稀释度为抗血清 *A* 值与同一稀释度阴性血清 *A* 值之比大于 2 的最大稀释度, 作为抗血清终点稀释度, 即抗体效价。

(3) 动物免疫实验结果: 间接 ELISA 实验结果表明, 5 只小鼠均有特异性抗体产生, 效价均在 1 : 4 000 以上。紫柳素对紫柳素-OVA 与 5 号小鼠抗血清结合的竞争结果见图 4。间接竞争 ELISA 实验结果显示抑制率随着紫柳素竞争质量浓度的增加而增加, 说明小鼠的抗血清具有紫柳素特异性, 证实抗血清中含有针对紫柳素的特异性抗体。

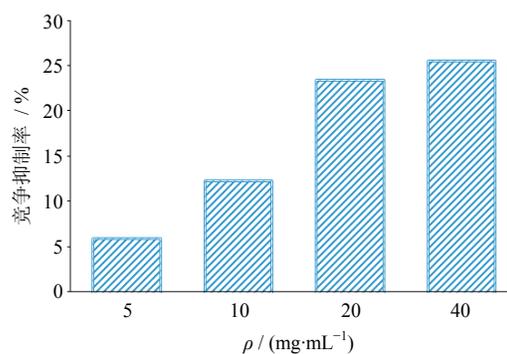


图 4 间接竞争 ELISA 检测抗血清的特异性
Fig. 4 Antiserum specificity detected by indirect competitive ELISA

3 讨论

半抗原的分子结构对免疫获得的抗体质量有重要影响,对半抗原分子结构进行合理设计,是制备小分子单克隆抗体的关键。紫柳素为黄酮类化合物,其人工抗原的合成非常困难,无法用常规的高碘酸钠氧化法和碳二亚胺法进行直接合成,本研究鉴于其化学结构中的羟基来设计抗原的合成^[16-17],采用氯乙酸钠法先在其羟基上连接羧基,然后再用碳二亚胺法进行合成,得到了紫柳素的人工抗原。根据洪孝庄等^[18]和屈会化等^[19]的研究可以采用基于羟基的多元酸酐法或氯乙酸钠法。因为间隔臂的介入位点,可能会改变半抗原的电子排布,空间结构等,所以间隔臂的介入点最好远离特征性的基团,这样可以最大程度的保证半抗原的极性与目标待测物的一致性。综上本实验室选用基于羟基的氯乙酸钠法合成人工抗原^[20],最终制备出紫柳素-BSA 人工抗原和紫柳素-OVA 人工包被抗原。

将紫柳素-BSA 人工抗原免疫小鼠获得抗紫柳素抗体,与骨髓杂交瘤细胞进行细胞融合,筛选出单克隆抗体细胞株,可得到高特异性的抗紫柳素细胞株。以此为基础,利用免疫亲和色谱技术可获得特异性敲除紫柳素的驱虫斑鸠菊水提物,通过比较驱虫斑鸠菊敲除紫柳素前后样品药效学的差异,可以阐明紫柳素是否是驱虫斑鸠菊的主要药效成分及其对药效的贡献有多大^[21]。另外利用紫柳素单克隆抗体建立 ELISA 分析方法,也可以解析紫柳素在动物体内,尤其在皮肤局部的吸收、分布等药代动力学特征,为其作用机制的研究提供了一种崭新的技术和方法。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准-维吾尔药分册 [S]. 1999.

[2] 范广建,张 坚,孙 力,等. HPLC 法测定驱虫斑鸠菊中紫柳素的含量 [J]. 中国药房, 2009, 20(30): 2366-2367.

[3] 刘铜华. 维药驱虫斑鸠菊治疗白癜风的研究与应用 [J]. 国外医学: 中医中药分册, 2004, 26(2): 103-104.

[4] 徐媛媛,唐定书,王慧娟. 驱虫斑鸠菊注射液治疗白癜风 56 例 [J]. 中外医疗, 2009, 28(8): 82.

[5] 沈燕娜,吴忠孝,杨谋哲,等. 驱虫斑鸠菊注射液联合窄谱中波紫外线治疗白癜风疗效观察 [J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2012, 11(2): 111-112.

[6] 石得仁,哈丽珊,茹 仙,等. 维吾尔医药驱虫斑鸠菊治疗白癜风对比观察 [J]. 新疆医学, 2003, 33(1): 51-52.

[7] 苏 歆,屈会化,李翼飞,等. 基于抗黄芩苷单克隆抗体的 ELISA 快速检测方法的建立 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(6): 946-949.

[8] 张海棠,李桂平,季跃光,等. 氨苄青霉素人工抗原的制备及抗体特性鉴定 [J]. 生物技术通报, 2009, (2): 138-141.

[9] 邓发亮,袁 强,刘晓云. 可卡因人工抗原的合成 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2011, 20(1): 43-46.

[10] 刘 洋,屈会化,任 燕,等. 人参皂苷 Rg₁ 人工抗原的合成及免疫原性鉴定 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1738-1742.

[11] Schneider P, Hammock B D. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for S-triazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 525.

[12] 屈会化,赵 琰,王雪茜,等. 黄芩苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(9): 606-609.

[13] 屈会化,张桂亮,赵 琰,等. 梔子苷人工抗原的合成与鉴定 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(6): 387-392.

[14] 张 越,屈会化,李翼飞,等. 甘草酸单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(5): 770-774.

[15] 李利东,宓晓黎,黄丽俊,等. 己烯雌酚免疫抗原的合成与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2011, 32(2): 29-32.

[16] 宋 娟,王榕妹,王悦秋,等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备 [J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1211-1218.

[17] 姚嘉赞,沈锦玉,郝贵杰,等. 氨基脲人工抗原的合成及其多克隆抗体的制备 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26(1): 33-35.

[18] 洪孝庄,孙曼霁. 蛋白质连接技术 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.

[19] 屈会化,赵 琰,李翼飞,等. 中药活性小分子人工抗原合成的技术要点 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1880-1885.

[20] 王 蓓,彭池方,胥传来. 己烯雌酚完全抗原的合成及分析 [J]. 化工学报, 2007, 58(6): 1523-1258.

[21] 赵 琰,屈会化,王庆国. 利用单克隆抗体特异性敲除技术解析中药药效物质基础的新方法 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 47-51.