

- methods on *Scutellaria baicalensis* georgi yield and baicalin content [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Nation* (承德民族职业技术学院学报), 2003, 2: 79-80.
- [8] Chen W L, Li S, He F L, et al. Effects of kind and thickness of covering grass on field on *Scutellaria baicalensis* Genorgi and baicalin content [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Natio* (承德民族职业技术学院学报), 2003, 4: 92-94.
- [9] Su W W. Grey system analysis on content of nitrogen phosphorous and potassium and active components on *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(9): 464-465.
- [10] He F L, Chen W X, Jiang S X, et al. Effects of organic fertilizer on total flavone and baicalin [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Natio* (承德民族职业技术学院学报), 2002, 4: 58-60.
- [11] Ding S C, Jiang F K. Comparative study on wild and cultivated *Scutellaria baicalensis* [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 1998, 17(11): 510-511.
- [12] Feng W S, Ji C R, Du T X, et al. The comparative analysis on composition of cultivated and wild *Scutellaria baicalensis* in henna [J]. *Chin Arch Henan Tradit Chin Med* (河南中医药学刊), 1994, 9(4): 5-8.
- [13] Song P S, Zhu J R, Ding Y H, et al. Quality assessment of cultivated *Scutellaria baicalensis* in Gansu [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 2003, 20(4): 44-46.
- [14] Li B, Du X W, Sun H F, et al. Dynamic study on culture quality of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 1999, 1: 45.
- [15] Cui Y J, Ban F Z, Zhang H P, et al. Effects of whole growth phase of *Scutellaria baicalensis* on baicalin content and *Scutellaria baicalensis* Georgi yield [J]. *Shandong Pharmacol Ind* (山东医药工业), 1996, 15(3): 53.
- [16] Fang Z, Yang J B, Wang K C, et al. Growth characteristics and accumulation of effective ingredient of *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(2): 84-85.
- [17] Xie L W, Guan X, Lv Q L, et al. Comparative study on the toxicity of cultivated and wild *Scutellaria baicalensis* [J]. *Info Chin Pharmacol* (中国药理学学会通讯), 2001, 18(4): 33-34.
- [18] Wang X M, Deng Y J, Zhong H J, et al. Study on best harvest time of cultivation *Scutellaria baicalensis* of Hebei Huairou [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(1): 5-7.

单链抗体技术及其在药用植物研究中的应用

马丽玲¹, 晁志^{2*}, 田中宏幸³

(1. 广州医学院护理学院 药检学科组, 广东 广州 510182; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515; 3. 九州大学大学院药学院, 日本 福岡 812-8582)

抗原刺激动物免疫系统产生抗体, 抗体识别抗原的部位在其重链和轻链的可变区(variable region)。如果将抗体的可变区(V_H和V_L)通过弹性多肽接头(peptide linker)稳定地连接在一起, 即为单链抗体(single chain fragments variable, scFv)。scFv 大小仅为完整抗体的 1/6, 但其完全保持了抗体的抗原特异性及抗原的结合能力, 同时由于为单链, 在大肠杆菌或植物体内等容易表达, 无须组装即能保持活性。在植物研究领域, 其可用于植物病理诊断、植物生物活性成分的检测、定量分析与分离精制; 而将单链抗体基因转入植物细胞, 更可使转基因植物获得诸如增强对病毒、除草剂等抗性, 体内生理活性物质增加, 次生代谢产物量提高等新特性。特别是通过转入单链抗体基因, 提高药用植物中具生物活性的次生代谢产物量的技术, 可望发展成为一种新的分子育种方法, 可以在不需要明了目标成分的生物合成途径的情况下, 提高其产量。

1 单链抗体的构建^[1]

基因工程单链抗体技术的基本原理是: 首先从杂交瘤细胞^[2]、外周血淋巴细胞^[3]中提纯 mRNA, 再经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别扩增抗体的重链可变区和轻链可变区编码基因, 人工合成一条寡核苷酸序列(即多肽接头), 将V_L的C端与V_H的N端或V_H的C端与V_L的N端相连接, 构建成单链抗体基因, 在一定的表达系统中得以表达。

人工合成的寡核苷酸多肽接头序列, 在单链抗体的构建

中十分重要, 接头必须能使重、轻链可变区自由折叠, 使抗原结合位点处于适当的构型, 并不引起分子动力学改变, 目前使用最多的接头序列是 Huston 根据 X 射线衍射分析抗体可变区结构的 15 肽序列(Gly₃Ser)₃, 许多研究者应用此序列构建单链抗体基因并表达出活性产物。

单链抗体的 C 末端可以引入半胱氨酸尾、酪蛋白激酶底物尾、E 尾等结构, 有助于标记和偶联其他分子; 也可以引入钙调蛋白尾、c-myc 尾、葡萄球菌 A 蛋白尾、脂类标签、组氨酸尾等, 使表达产物易于检测和纯化。

常用的单链抗体表达系统有细菌(最常用为大肠杆菌 *Escherichia coli*)、酵母、动物细胞(昆虫细胞、COS 细胞、CHO 细胞等, 最常用为乳腺细胞)、植物细胞、噬菌体等。其中使用噬菌体的表达技术称为噬菌体展示(phage display), 是近年来常用的一种手段。

2 单链抗体技术在植物研究中的应用

单链抗体技术在肿瘤的诊断和生物治疗方面显示良好的应用前景^[4], 备受瞩目以外, 随着近年来抗体工程学的进步, 在植物学研究领域, scFv 及其应用也日益受到重视。

2.1 植物病理诊断: Harper 等^[5]从合成的噬菌体抗体库中筛选出了针对马铃薯卷叶黄症病毒(potato leafroll luteovirus, PLRV)特异的单链抗体; 然后将编码此 scFv 的 DNA 重组至 pDAP2 质粒中, 转化大肠杆菌, 用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其产生抗 PLRV 单链抗体——碱

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500652)

作者简介: 马丽玲, 女, 江西高安人, 讲师, 主要从事生物化学及检验研究。

* 通讯作者 晁志 Tel: (020)61648256 E-mail: chaozhi@fimmu.com

性磷酸酶融合蛋白(产物质量浓度为 10 mg/L 培养液)。此融合蛋白能够直接应用于 ELISA 法,来检测被感染植物汁液中的 PLRV。

2.2 增强植物抗病害性:Tavladoraki 等^[6]将抗朝鲜蓟斑纹病毒(artichoke mottled crinkle virus, AMCV)外壳蛋白抗体的 scFv 的编码基因通过农杆菌介导,转入烟草细胞;再生的植株体内检测到其表达,具有抗 AMCV 的特性,针对 AMCV 的抗性是和 scFv 的表达直接相关的。

Fecker 等^[7]对甜菜坏疽黄脉病毒(beet necrotic yellow vein virus, BNYVV)的研究也证明了抗 BNYVV 外壳蛋白 scFv 的表达能产生具有防止或减少 BNYVV 感染能力的烟草植株。他们分别对表达抗 BNYVV 外壳蛋白 scFv 的烟草植株和对照植株接种 BNYVV,发现在前者中检测到感染的时间长于后者;另外,表达 scFv 的植株在感染后期,病毒引起的病症较对照轻。这说明抗 BNYVV 外壳蛋白 scFv 在植物中的表达,增强了植物对 BNYVV 感染的抵抗能力,延迟发病,减轻发病后的症状。

Eto 等^[8]将抗除草剂氯苯胺灵(chlorpropham)的 scFv 转入拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 细胞,分别定位于内质网(endoplasmic reticulum, ER)腔、胞质溶胶(cytosol)、质外体(apoplast space)和质膜上,经检测,除了胞质溶胶以外,都可以发现抗氯苯胺灵 scFv 的表达。其中,在内质网中有高 scFv 表达量的转基因植物与没有转入 scFv 基因的植物相比,对氯苯胺灵的抗性明显增强。

2.3 增加植物生理活性物质:Artsaenko^[9]在研究脱落酸(abscisic acid, ABA)的生理功能的过程中,通过农杆菌介导转入抗 ABA scFv 基因,在烟草细胞表面表达了具活性的抗 ABA scFv,使得植物体内 ABA 以和 scFv 结合体的形式沉积于内质网,促进植物不断合成 ABA,并大量积累,可达 120~1 050 ng/g 植株鲜重,是普通野生型烟草植株(30~100 ng/g)的 2~10 倍。

3 单链抗体应用于药用植物研究

3.1 提高药用植物中具生物活性的次生代谢产物量:转入 scFv 基因可赋予植物新的特性。基于此,提出了将药用植物中具生物活性的次生代谢产物的 scFv 基因,转入基原植物,以提高该物质在植物中量的设想。毛喉素(forskolin)是腺苷酸环化酶的直接激动剂,来源于唇形科植物毛喉鞘蕊花 *Coleus forskahlii* (Willd.) Briq., 现作为强心、降压药使用。由于其结构特殊,化学合成困难而不经济。若将抗毛喉素单链抗体基因转入毛喉鞘蕊花,可能培育出含毛喉素较高的新品种,从而提高毛喉素的产量^[2]。

在此思想指导下,田中宏幸等^[10]针对药用植物喀西茄 *Solanum khasianum* C. B. Clarke 中的药理活性成分澳洲茄碱糖苷(solasodine glycosides)制作了单克隆抗体,从分泌抗体的杂交瘤细胞中提取 RNA,扩增出 V_H、V_L 基因并构建了 scFv,通过载体转化发根农杆菌插入 Ri 质粒 T-DNA 中,然后感染喀西茄植株,诱导产生毛状根。在毛状根中检测到 scFv 的表达,同时澳洲茄碱糖苷的产量较未转化的普通毛

状根上升了 3 倍,产量与 scFv 的表达水平呈正相关。

这种方法可望逐渐发展成为一种新的分子育种方法,特别是其可以在不需要明了目标成分的生物合成途径的情况下,提高其量的特性,使其在绝大多数成分的生物合成途径还未阐明的药用植物研究领域有广阔的应用前景^[11],特别是一些重要的化合物,如紫杉醇等。

3.2 植物生物活性成分的检测、定量分析与分离精制:药用植物生物活性成分的检测、定量分析与分离精制。目前,单克隆抗体已经广泛应用于研究^[12~16]。最近的例证表明,单链抗体具有和单克隆抗体相同的基本特性,因而也有良好的应用前景。

陆昭华等^[17]从分泌抗芍药苷单克隆抗体的杂交瘤细胞株 C31B9 中,克隆了可变区(V_H 和 V_L)基因,以(Gly₄Ser)₃ 接头 DNA 连接;装配成的 scFv 基因重组至 pET28a 质粒,在大肠杆菌中表达,得到内涵体形式的重组蛋白;经重折叠和纯化,从 100 mL 培养液中得到 1.89 mg scFv。得到的 scFv 与母体单克隆抗体(MAb C31B9)具有相似的特性,将其应用于 ELISA 法,测定白芍药材中芍药苷和芍药内酯苷,线性范围为 0.78~25 μg/mL。

4 结语

单链抗体技术应用于药用植物研究领域的时间虽然比较短,这方面的研究还比较少,但其在药用植物的优质品种培育,以及药用植物生物活性成分的检测、定量分析与分离精制方面已显示出了其特有的潜力。随着研究的拓展和深入,可望取得比较大的发展。

References:

- [1] Wu G J, Hao X K. Proceeding in researches on single chain fragment vialbe (scFv) and application of scFv in diagnosis and treatment of cancer [J]. *Clin Biochem Lab Med Foreign Med Sci*, 1999, 20(1): 33-34.
- [2] Shoyama Y. Pharmacognosical study on secondary metabolites [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2000, 120(9): 749-765.
- [3] Chae J S, Choi J K, Lim H T, et al. Generation of a murine single chain Fv (scFv) antibody specific for cucumber mosaic virus (CMV) using a phage display library [J]. *Mol Cells*, 2001, 11(1): 7-12.
- [4] Hudson P J, Sourian C. Engineered antibodies [J]. *Nat Med*, 2003, 9: 129-134.
- [5] Harper K, Kerschbaumer R, Ziegler A, et al. A scFv-alkaline phosphatase fusion protein which detects potato leafroll luteovirus in plant extracts by ELISA [J]. *J Virol Methods*, 1997, 63: 237-242.
- [6] Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack [J]. *Nature*, 1993, 366: 469-472.
- [7] Fecker L F, Koenig R, Obermeier C. *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection [J]. *Arch Virol*, 1997, 142: 1857-1863.
- [8] Eto J, Suzuki Y, Ohkawa H, et al. Anti-herbicide single-chain antibody expression confers herbicide tolerance in transgenic plants [J]. *FEBS Lett*, 2003, 550(1-3): 179-184.
- [9] Artsaenko O, Peisker M, Nieden U, et al. Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilty phenotype in transgenic tobacco [J]. *Plant J*, 1995, 8: 745-750.

- [10] Putalun W, Taura F, Qing W, et al. Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 22: 344-349.
- [11] Bernal A J, Willats W G T. Plant science in the age of phage [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(10): 465-468.
- [12] Putalun W, Tanaka H, Shoyama Y. Rapid detection of glycyrrhizin by immunochromatographic assay [J]. *Phytochem Anal*, 2005, 16(5): 370-374.
- [13] Zhu S H, Shimokawa S, Shoyama Y, et al. A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins [J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(2): 100-104.
- [14] Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y. Detection and quantification of ginsenoside Re in ginseng samples by a chromatographic immunostaining method using monoclonal antibody against ginsenoside Re [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 830(1): 100-104.
- [15] Morinaga O, Fujino A, Tanaka H, et al. An on-membrane quantitative analysis system for glycyrrhizin in licorice roots and traditional Chinese medicines [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(4): 668-672.
- [16] Tanaka H, Fukuda N, Yahara S, et al. Isolation of ginsenoside Rb₁ from *Kalopanax pictus* by eastern blotting using anti-ginsenoside Rb₁ monoclonal antibody [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 255-258.
- [17] Lu Z, Massaki T, Shoyama Y, et al. Construction and expression of a single chain Fv fragment against pharmacologically active paeoniflorin in *Escherichia coli*, and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Planta Med*, 2006, 72(2): 151-155.

硒多糖的研究与应用进展

李晓坤, 闫吉昌*, 崔晓莹, 翟玉娟, 石金娥, 闫福成

(东北师范大学化学学院, 吉林 长春 130024)

硒是生命必需的微量元素^[1], 是谷胱甘肽过氧化物酶的主要活性成分, 它可以直接或间接地清除体内氧自由基, 可抑制脂氧化或过氧化, 并能引起过氧化物的广泛分解或还原。某些癌症、肿瘤、心血管疾病、克山病、大骨节病和艾滋病等^[2~4]都与体内缺硒有关。

但是, 硒不能由生物体自主合成, 只能通过外吸收获得。硒在自然界中的存在形式分为无机硒与有机硒 2 种。与无机硒相比, 有机硒因其具有更高的生物活性和更低的毒性而易被生物体吸收利用。有机硒包括硒多糖、硒蛋白、硒核酸等。其中硒多糖又称硒酸酯多糖、硒化卡拉胶(Kappa-Se), 是硒与活性多糖键合的化合物。硒多糖能发挥微量元素硒和多糖的双重功能, 并且活性高于硒与多糖。目前国外多研究有机硒药物的合成及在生物体内的作用和代谢机制, 但对硒多糖的研究较少。而我国的中药中, 大多数都含有多糖甚至硒多糖, 因此研究和应用较多。近年来, 硒多糖在抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、抗衰老等发面发挥越来越多的作用。

1 硒多糖的来源与结构

硒多糖一般存在于高等植物、微生物中。硒作为硒多糖的特征性部分^[5], 在硒多糖中的存在形式可能有-SeH 和 R₁SeO₂R₂ 2 种, 其中后者同时含有硒氧单键和硒氧双键。硒多糖在天然植物或微生物中量甚少。在高硒地区的富硒植物中, 所含硒多糖中硒也仅有百分之一。但利用一定的富硒手段如人工胁迫富硒栽培、富硒酵母培养等可以使硒多糖增加。Lisk 等^[6]经过实验证实, 市售大蒜的含硒量小于 0.05 μg/g, 而通过人工富硒培养可达到 0.1~1.355 mg/g。

不仅硒多糖在植物和微生物中量较少, 同时与硒键合的多糖结构复杂, 这都给硒多糖的提取和纯化以及结构分析带

来一定的困难。借助于凝胶色谱和薄层色谱等可进行分离纯化, 借助于紫外、红外和核磁共振等波谱可对硒多糖进行结构验证。已经有很多研究者进行天然硒多糖的提取、分离和利用生物或化学手段进行人工合成的研究, 并取得一定的成果。

1.1 天然硒多糖的提取: 尚德静等^[7]对灵芝菌丝深层富硒培养后, 利用 DEAE-cellulose 柱色谱纯化出 6 种硒多糖, 并对其中的 1 种 SeGLP-1 进行了结构分析。经 Sephadex G-100、聚丙烯酰胺凝胶电泳和紫外光谱分析鉴定, SeGLP-1 为均一组分; 经红外光谱分析, 确定 SeGLP-1 是由 α-糖苷键连接的吡喃多糖。同时, 测得 SeGLP-1 中含硒的量为 1.642 mg/g; 并利用红外光谱、核磁共振、激光拉曼光谱等推断, SeGLP₁ 中 Se 活性中心的可能为 O=Se=O, 即 Se 取代了灵芝多糖 GLP₁ 中甲氧基结构上的甲基, 从而形成了硒氧双键结构。

杨铭等利用 G25-G200 葡萄糖凝胶色谱柱进行过滤, 从湖北高硒地区恩施产的富硒大蒜中提取分离出相对分子质量为 1.5×10⁴ 的大蒜硒多糖, 经高效液相色谱法及纸色谱检验, 其组成化学成分均一, 为甘露聚糖与硒的化合物。药现实验表明, 大蒜硒多糖具有清除活性氧自由基的能力, 对 SiO₂ 引起的细胞损伤有保护作用, 对细胞特异性病变抑制显示出较好的结果, 对人巨细胞病毒形成空斑的抑制率为 38.6%。能阻止高分子蛋白质的形成, 在预防紫外照射对晶状体的氧化损伤有重要的保护作用。

1.2 人工合成: 在保留了硫酸酯多糖的基本构型的情况下, 利用硒取代部分硫制备了硒化角叉菜胶。动物实验表明, 硒化角叉菜胶的生物利用性与生理增益效应均优于亚硒酸钠。刘建林等^[9]对硒化 κ-角叉菜胶进行元素分析、红外光谱、拉