

## · 药剂与工艺 ·

人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 人工抗原的合成及免疫原性鉴定

刘洋<sup>3,4</sup>, 屈会化<sup>2,4\*</sup>, 任燕<sup>3,4</sup>, 吴婷婷<sup>1,4</sup>, 薛瑾<sup>1,4</sup>, 孙晔<sup>1,4</sup>, 赵琰<sup>1,4\*</sup>, 王庆国<sup>1,4\*</sup>

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 合成人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的人工免疫原和包被原, 为后续制备人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 的单克隆抗体及建立相应的免疫分析方法奠定基础。方法 采用 NaIO<sub>4</sub> 氧化法分别合成人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 免疫抗原 (Rg<sub>1</sub>-BSA) 和包被抗原 (Rg<sub>1</sub>-PLL); 紫外光谱和薄层色谱法鉴定人工抗原偶联是否成功; 用间接 ELISA 方法检测免疫小鼠血清中抗体效价, 用间接竞争 ELISA 检测抗体特异性。结果 经紫外光谱和薄层色谱法检测, 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 与 BSA/PLL 偶联成功; 免疫小鼠后 Rg<sub>1</sub>-BSA 可以使小鼠体内产生抗 Rg<sub>1</sub> 抗体; 利用合成的偶联物成功建立间接 ELISA 和间接竞争 ELISA 方法, 测得小鼠血清抗体效价在 1:80 000 以上, 并且所得抗体能特异性结合人参皂苷 Rg<sub>1</sub>。结论 成功合成了人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 人工免疫原和包被原, 可用于下一步的人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 单克隆抗体制备及建立相应免疫分析方法。

**关键词:** 人参皂苷 Rg<sub>1</sub>; 人工抗原; NaIO<sub>4</sub> 氧化法; 单克隆抗体; 免疫分析

**中图分类号:** R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)13-1738-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.13.008

## Synthesis and immunogenicity identification of artificial antigen of ginsenoside Rg<sub>1</sub>

LIU Yang<sup>3,4</sup>, QU Hui-hua<sup>2,4</sup>, REN Yan<sup>3,4</sup>, WU Ting-ting<sup>1,4</sup>, XUE Jin<sup>1,4</sup>, SUN Ye<sup>1,4</sup>, ZHAO Yan<sup>1,4</sup>, WANG Qing-guo<sup>1,4</sup>

1. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Center of Scientific Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
3. College 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 the artificial antigen of ginsenoside Rg<sub>1</sub>-bovine serum albumin (Rg<sub>1</sub>-BSA) and the artificial coated antigen of ginsenoside Rg<sub>1</sub>-polylysine (Rg<sub>1</sub>-PLL), and to provide the basis for the preparation of monoclonal antibody (MAb) and the establishment of immunoassay method. **Methods** Rg<sub>1</sub>-BSA and Rg<sub>1</sub>-PLL were synthesized by sodium periodate oxidation method. The characterization of the synthesis was examined by UV spectrometry and TLC method. The titer and specificity of the antibody in serum of immunised mice were detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) and indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (I-CELISA), respectively. **Results** According to the UV and TLC, the Rg<sub>1</sub> was successfully conjugated with BSA and PLL. I-ELISA and IC-ELISA methods were developed using Rg<sub>1</sub>-PLL. The anti-Rg<sub>1</sub> antibody

收稿日期: 2012-12-18

基金项目: 国家自然科学基金资助 (30973709, 81274043); 教育部留学回国人员科研启动基金

作者简介: 刘洋 (1988—), 女, 硕士研究生。Tel: (010)64286705 E-mail: ly\_8812@126.com

\*通信作者 赵琰 Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@gmail.com

王庆国 Tel: (010)64286727 E-mail: wangqg8558@sina.com

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

网络出版时间: 2013-04-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130417.0835.001.html>

obtained from immunized mice could bind to Rg<sub>1</sub> specially and the titer was up to 1 : 80 000. **Conclusion** The artificial immunogen Rg<sub>1</sub>-BSA and coated antigen Rg<sub>1</sub>-PLL are successfully synthesized, which could be used to prepare the MAb of Rg<sub>1</sub> and establish the immunoassay method.

**Key words:** ginsenoside Rg<sub>1</sub>; artificial antigen; sodium periodate oxidation; monoclonal antibody; immune analysis

人参皂苷(ginsenoside, GS)是人参的主要有效成分,由于其影响了多重代谢通路,药理作用十分广泛,近20年来一直是研究的热点。以“人参皂苷”为关键词,检索CNKI数据库发现收录文章近3 000篇,2006年度发表文章超过200篇,之后每年度呈持续增长趋势,2011年度收录文献达406篇。现已明确知道的GS单体约有40余种,它们具有相似的基本结构,其中人参皂苷Rg<sub>1</sub>(Rg<sub>1</sub>)的主要作用靶器官为中枢神经系统,诸多研究从不同角度证实了其具有神经营养和神经保护作用<sup>[1-3]</sup>,最近还发现Rg<sub>1</sub>有抗肝纤维化的作用<sup>[4]</sup>,因此Rg<sub>1</sub>具有重要的临床应用前景。

对Rg<sub>1</sub>进行深入研究,迫切需要建立快速、灵敏、高效的定量方法。目前传统检测方法为HPLC法,近年来建立和改进的方法有高分离度快速液相色谱(RRLC)法、高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)法、反相高效液相色谱-蒸发光散射检测(RP-HPLC-ELSD)法、高效液相二极管阵列检测(HPLC-DAD)法等<sup>[5-9]</sup>。但这些方法样品前处理复杂,当待测样品中Rg<sub>1</sub>的量很低时,或者待测样本数量很大时具有局限性,很难满足研究需要。基于中药小分子单克隆抗体的免疫学分析方法,具有灵敏度高、特异性强的特点,并且由于样品中的其他物质对测定结果的干扰很小,不需要复杂的前处理过程,所用实验试剂、仪器及操作也十分简单,而且还可进行高通量检测<sup>[10-11]</sup>。因此,建立用于Rg<sub>1</sub>定性定量分析的免疫学分析方法,具有十分广阔的应用前景。

免疫分析方法建立的前提是抗体制备,Rg<sub>1</sub>属于小分子化合物,相对分子质量为801.01,只具有反应原性而不具有免疫原性,作为半抗原必须和载体蛋白偶联,才能作为免疫原免疫动物产生特异性抗体。为建立Rg<sub>1</sub>的免疫分析方法,本研究首先对Rg<sub>1</sub>的人工完全抗原进行了合成与鉴定。

## 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,动物许可证号:SCXK-(京)2007-004,实验动物质量合格证号:NO 0029729。

Rg<sub>1</sub>, HPLC测定质量分数为98%,南京泽朗医药科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA),美国Roche公司;多聚赖氨酸(PLL)、弗式完全佐剂(F5881)、弗式不完全佐剂(F5506),美国Sigma公司;NaIO<sub>4</sub>,分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司;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);碳酸盐缓冲液(CBS, pH 9.6, 0.05 mmol/L);洗涤缓冲液(PBST, pH 7.4);终止液(2 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);底物缓冲液(pH 5.0, 磷酸柠檬酸配制);底物显色液(TMB)。

96孔酶标板,Corning公司;Beckman Coulter DU 800紫外-可见分光光度计,德国Beckman公司;Tecan Safire2全波长多功能酶标仪,瑞士Tecan公司;84—1A磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 Rg<sub>1</sub>人工抗原的合成

本研究采用NaIO<sub>4</sub>法,参考文献方法<sup>[12]</sup>并改进,将Rg<sub>1</sub>分别与BSA偶联成人工免疫原,与PLL偶联成包被原。准确称取Rg<sub>1</sub> 10.0 mg充分溶于1 mL 80%甲醇中,NaIO<sub>4</sub> 10.0 mg充分溶于1 mL蒸馏水中,将二者混合,放入磁力搅拌器转子,密封并用锡箔纸包裹避光,室温下搅拌反应5 h,得到Rg<sub>1</sub>氧化后产物,成为A液。准确称取BSA、PLL各10.0 mg,分别充分溶于1 mL CBS中,成为B液。然后将A液逐滴加入B液中,封闭并避光,在4 ℃下搅拌过夜。待上述反应完成后,将反应液转移至用蒸馏水预处理的透析袋中,搅拌下用蒸馏水透析72 h,中间多次换液。透析后的产物分装,于-20 ℃保存,待用。

### 2.2 Rg<sub>1</sub>人工抗原和包被原的鉴定

**2.2.1 紫外扫描法** 用蒸馏水精确配制500 mg/mL的Rg<sub>1</sub>与BSA标准溶液,将待测样品Rg<sub>1</sub>-BSA用蒸馏水稀释到10倍,用紫外分光光度计测出Rg<sub>1</sub>、BSA、Rg<sub>1</sub>-BSA的全波长图谱(图1)。结果在277 nm处可见紫外最大吸收峰,Rg<sub>1</sub>-BSA、BSA的紫外吸收值分别为0.211 7、0.595 1,而Rg<sub>1</sub>几乎无紫外吸收(0.004 5)。Rg<sub>1</sub>、BSA紫外吸收特征具有明显差异,而Rg<sub>1</sub>-BSA偶联物的紫外吸收兼具Rg<sub>1</sub>、BSA的特征,据此可以判断偶联成功。由于PLL与Rg<sub>1</sub>均无

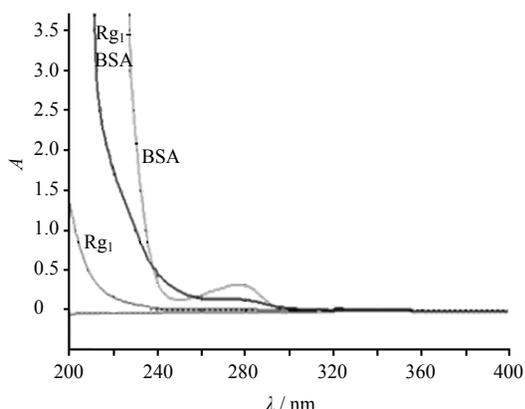


图 1 Rg<sub>1</sub>、BSA 和 Rg<sub>1</sub>-BSA 的全波长图谱  
Fig. 1 Spectrum of full wavelength for Rg<sub>1</sub>, BSA, and Rg<sub>1</sub>-BSA

最大紫外吸收，只在末端存在微弱的吸收，紫外扫描图谱无明显差异。

**2.2.2 薄层色谱法** 用蒸馏水配制 1 mg/mL 的 Rg<sub>1</sub>、BSA、PLL 标准溶液，将待测样品 Rg<sub>1</sub>-BSA 和 Rg<sub>1</sub>-PLL 用蒸馏水稀释到 1 mg/mL。将 5 个样品分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以醋酸乙酯-甲醇-水 (8:2:1) 为展开剂，展开后晾干，用 10% 硫酸-乙醇溶液显色。

从薄层结果 (图 2) 中可以看出，在该展开条件下，Rg<sub>1</sub> 会移动到特定位置，并在显色剂作用下，显示出紫红色斑点；BSA、PLL 在此条件下并不会展开，且不会显色。Rg<sub>1</sub>-BSA 和 Rg<sub>1</sub>-PLL 在相同条件下并未展开到 Rg<sub>1</sub> 的特定位置，说明二者具备了载体蛋白的特点，二者在点样原点显色，说明其具备了 Rg<sub>1</sub> 的特点，以上结果显示 Rg<sub>1</sub>-BSA 和 Rg<sub>1</sub>-PLL 偶联成功。



1-Rg<sub>1</sub> 2-Rg<sub>1</sub>-BSA 3-BSA 4-Rg<sub>1</sub>-PLL 5-PLL

图 2 Rg<sub>1</sub>-BSA 和 Rg<sub>1</sub>-PLL 的薄层色谱图  
Fig. 2 TLC results of Rg<sub>1</sub>-BSA and Rg<sub>1</sub>-PLL

**2.2.3 小鼠免疫** 用 Rg<sub>1</sub>-BSA 免疫原以背部皮下多点注射的方法免疫 5 只雄性 BALB/c 小鼠。初次免疫用等量的弗式完全佐剂充分乳化抗原，免疫剂量为 100 μg/只，以后每两周加强免疫 1 次，改用弗式不完全佐剂乳化抗原，免疫剂量不变。第 4 次加强免疫后 1 周断尾取血，3 000 r/min 离心 5 min，分离血清。

**2.2.4 间接 ELISA 法测定血清中的抗体效价** 以 Rg<sub>1</sub>-PLL 作为包被原，用 CBS 稀释至 1:4 000，在 96 孔板上每孔加 100 μL，37 °C 孵育 2 h。以 PBST 洗板，每次 5 min，共 4 次。以 50 mg/mL 脱脂奶粉为封闭液，每孔加 200 μL，37 °C 孵育 2 h，洗板。抗血清稀释倍数分别为 1 000、2 000、4 000、8 000、10 000、20 000、40 000、80 000 倍。以空白小鼠的血清作为阴性对照，37 °C 孵育 1 h，洗板。每孔加入 100 μL 酶标二抗 (1:10 000)，37 °C 孵育 1 h，洗板。每孔加入 TMB 工作液 100 μL，37 °C 孵育显色 15 min 后，每孔加 2 mmol/L 硫酸 50 μL 终止反应，测定 450 nm 处吸光度 (A<sub>450</sub>) 值。以同一稀释倍数下抗血清与阴性血清 A<sub>450</sub> 比值大于 2.1 时血清的最大稀释度定为抗体效价，结果见图 3。经过多次免疫后的 5 只小鼠血清均有抗体产生，效价均在 1:80 000 以上。

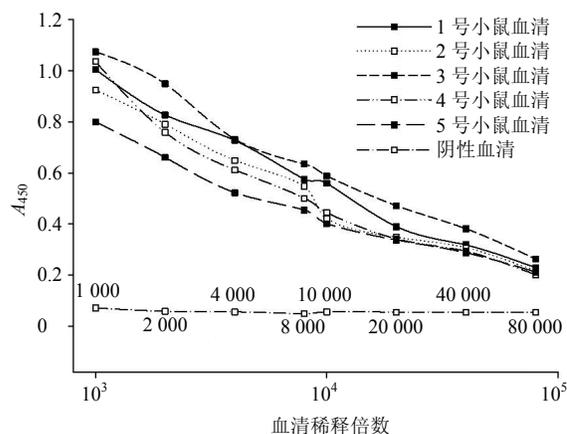


图 3 间接 ELISA 法检测血清抗体效价

Fig. 3 Determination for antiserum titer by indirect-ELISA

**2.2.5 间接竞争 ELISA 法测定血清中的抗体特异性** 以 Rg<sub>1</sub>-PLL 作为包被原，用 CBS 稀释至 1:8 000，在 96 孔板上每孔加 100 μL，37 °C 孵育 2 h。以 PBST 洗板，每次 5 min，共 4 次。以 50 mg/mL 脱脂奶粉为封闭液，每孔加 200 μL，37 °C 孵育 2 h，洗板。小鼠抗血清稀释倍数为 1 000，Rg<sub>1</sub> 小分子稀释为 6 个质量浓度，设置对照孔质量浓度为 0 μg/mL，每

孔分别加入不同质量浓度的 Rg<sub>1</sub> 和抗血清各 50 μL, 37 °C 孵育 1 h, 洗板。每孔加入 100 μL HRP-羊抗鼠酶标二抗 (1 : 10 000), 37 °C 孵育 1 h, 洗板。每孔加入 TMB 工作液 100 μL, 37 °C 孵育显色 15 min 后, 每孔加 2 mmol/L 硫酸 50 μL 终止反应, 测定 A<sub>450</sub> 值。

经检测, Rg<sub>1</sub> 对 5 只免疫小鼠的抗血清均具有竞争抑制, 表明免疫小鼠血清中产生的抗体具有 Rg<sub>1</sub> 特异性。以对照孔的 A<sub>450</sub> 值为 A<sub>0</sub>, 浓度对应的 A<sub>450</sub> 值为 A, 计算小鼠抗血清间接竞争抑制曲线的线性方程和 R<sup>2</sup>, 以及灵敏度 (抑制率为 50% 时 Rg<sub>1</sub> 的质量浓度), 结果见表 1。

$$\text{抑制率} = 1 - A / A_0$$

灵敏度最高 (27 μg/mL) 的 1 号小鼠抗血清竞争抑制曲线见图 4。

表 1 Rg<sub>1</sub>-BSA 免疫小鼠抗血清的间接竞争试验结果

Table 1 Results of indirect competitive ELISA for antiserum of Rg<sub>1</sub>-BSA immunised mice

n	线性方程	R <sup>2</sup>	灵敏度 / (μg·mL <sup>-1</sup> )
1	Y=6.563 lnX+28.27	0.963	27
2	Y=5.285 lnX+20.96	0.932	36
3	Y=6.093 lnX+22.00	0.980	97
4	Y=3.372 lnX+30.56	0.892	318
5	Y=6.874 lnX+19.87	0.901	80

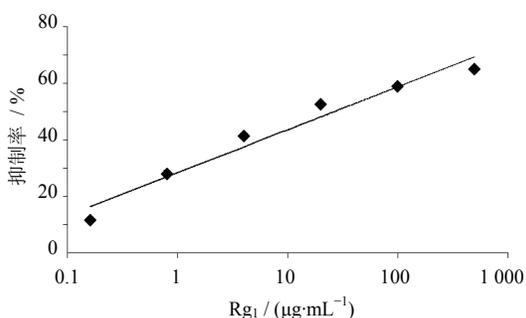


图 4 Rg<sub>1</sub>-1 号小鼠抗血清竞争抑制曲线

Fig. 4 Inhibition curve of antiserum competition in Rg<sub>1</sub>-1 immunised mice

### 3 讨论

人工抗原合成是制备小分子单克隆抗体的关键步骤。依据小分子结构特征的不同, 人工抗原的合成有多种方法, 需要全面衡量各方面条件选择具体人工抗原的合成方法<sup>[13]</sup>。其中 NaIO<sub>4</sub> 氧化法可以将小分子半抗原中苯环结构的邻羟基氧化为双醛基, 继而进一步方便其与大分子载体蛋白相偶联, 合成

方法较为简便, 并且可在对小分子半抗原结构改变最小下完成合成过程, 能够最大限度地保护小分子半抗原中的有效基团。用该合成方法制备的人工抗原免疫动物, 往往可以得到效价较高、亲和性良好的稳定细胞株。本研究即采用高碘酸钠氧化法制备 Rg<sub>1</sub> 人工抗原, 对今后相似结构的其他半抗原合成提供了技术经验。

目前鉴别人工抗原合成成功与否的常规方法有紫外光谱和飞行质谱法等。本实验在研究过程中发现这两种方法均存在一定的局限性: (1) 紫外光谱是利用最大吸收值的变化进行鉴别, 仅适用于有紫外吸收的化合物, 而对于甾类和萜类等无紫外吸收的化合物, 此方法则无能为力。如本研究中 Rg<sub>1</sub> 虽在 203 nm 处检测到最大紫外吸收, 但该处过于靠近紫外扫描的低端检测线, 因此用该方法对人工抗原进行检测, 并不能得到较为理想的实验结果。(2) 不是所有的化合物都能用飞行质谱鉴别出来, 由于人工抗原的合成需要经历一系列的氧化-还原、加热等处理方法, 所以合成的偶联率比较小, 后期纯化工序难度大, 所以给鉴别带来很大困难。另外用飞行质谱鉴别的价格也是非常昂贵的, 特别是在合成条件需要优化的情况下, 如对每次合成的人工抗原都采用飞行质谱进行鉴别是不现实的。因此, 虽然飞行质谱是鉴别人工抗原合成的较好方法, 但在实际研究过程中亦存在一定的局限性。

虽然在天然药物领域利用薄层色谱进行鉴别是非常普遍的方法, 但是该方法应用于人工抗原的鉴定目前还未见报道。薄层色谱鉴别合成抗原的优势在于: 小分子在展开剂作用下可以展开, 在显色剂作用下可显色; BSA、PLL 等载体蛋白不能展开只能吸附在斑点, 不会显色; 而小分子与载体蛋白偶联之后也被吸附在斑点不能展开, 但因偶联了小分子在显色剂作用下亦可显色。本研究在 Rg<sub>1</sub> 人工抗原合成过程中, 将多个样品在同一硅胶薄层板上点样, 采用《中国药典》2010 年版记载的展开条件 [醋酸乙酯-甲醇-水 (8 : 2 : 1)], 采用通用的显色剂 (10% 硫酸-乙醇) 显色, 结果表明, Rg<sub>1</sub>、BSA、PLL、Rg<sub>1</sub>-BSA、Rg<sub>1</sub>-PLL 的薄层特征具有显著差异, 结果易于判断, 准确率 100%。此方法简便、快捷、成本低, 且样品使用量非常小, 几乎适用于所有化合物, 可以有效提高人工抗原合成方法研究的效率。

小分子人工抗原合成成功与否, 最有力的证据是能否产生特异性抗体。采用本研究合成的 Rg<sub>1</sub> 人

工抗原免疫小鼠后, 间接竞争 ELISA 检测结果表明所合成的 Rg<sub>1</sub>-BSA 可以使小鼠体内产生抗 Rg<sub>1</sub> 抗体, 效价在 1 : 80 000 以上; 而 Rg<sub>1</sub>-PLL 亦可以用作间接竞争 ELISA 法的包被原, 检测结果显示抗体具有 Rg<sub>1</sub> 特异性。此结果也有力佐证了本实验建立的人工抗原薄层色谱鉴定方法是成功可靠的。

#### 参考文献

- [1] 包翠芬. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 对抗脑缺血再灌注细胞凋亡及 p-JNK 表达的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2009.
- [2] 包翠芬, 刘霞, 魏嘉, 等. 人参皂甙 Rg<sub>1</sub> 对脑缺血-再灌注大鼠基质金属蛋白酶 2 和 9 表达的影响 [J]. 中国脑血管病杂志, 2009, 6(2): 88-92.
- [3] 安明, 赵国君, 韦新成. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 保护心血管和中枢神经系统的药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(1): 75-77.
- [4] 董向前, 段丽平, 梁兵, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 和 Rb<sub>1</sub> 抗肝纤维化的体视学研究 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2012, 50(1): 85-88.
- [5] 洪秀云, 吴晓英. 高效液相色谱-蒸发光检测法检测纹股蓝皂苷大孔树脂纯化产物 [J]. 食品科学, 2012, 33(14): 251-254.
- [6] 王艳杰, 越皓, 王淑敏, 等. 高分离度快速液相色谱法检测人参皂苷的研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2010, 26(6): 824-826.
- [7] 石威, 王玉堂, 权新军, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定人参根中人参皂苷的含量 [J]. 分析化学, 2006, 34(2): 243-246.
- [8] 赵岩, 刘金平, 卢丹, 等. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定西洋参和西洋红参中人参皂苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(10): 1956-1958.
- [9] 韦英杰, 李萍, 李松林. 高效液相二极管阵列检测法同时测定复方丹参制剂中 7 个成分的含量 [J]. 分析化学, 2006, 34(12): 1702-1706.
- [10] Chuang J C, Van Emon J M, Jones R, *et al.* Development and application of immunoaffinity column chromatography for atrazine in complex sample media [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 583(1): 32-39.
- [11] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 利用免疫芯片技术筛查中药注射剂致敏成分 [J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 23-25.
- [12] 赵寿经, 侯春喜, 钱延春, 等. 人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 单克隆抗体的制备与鉴定 [J]. 吉林大学学报: 工学版, 2007, 37(1): 245-248.
- [13] 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.