

抗银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的单克隆抗体制备

李芳^{1,2,3}, 赵妮⁴, 王振中^{1,2,3}, 秦爱建⁴, 萧伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001
4. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

摘要: **目的** 制备抗银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的单克隆抗体。**方法** 将银杏叶总蛋白进行二维电泳, 取蛋白点进行质谱分析并合成多肽。利用多肽作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 细胞进行融合, 通过间接 ELISA 方法筛选抗银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的单克隆抗体。**结果** 5株单克隆抗体亚类鉴定均为 IgM, 轻链为 Kappa 链。Western blotting 实验证实单抗均能与银杏叶蛋白反应。**结论** 单克隆抗体的制备为快速检测银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的方法建立奠定了基础。

关键词: 银杏二萜内酯葡胺注射液; 银杏叶; 蛋白; 单克隆抗体; 免疫原

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)20-2828-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.20.008

Preparation of monoclonal antibody against proteins of ginkgo diterpene lactones meglumine injection

LI Fang^{1,2,3}, ZHAO Ni⁴, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, QIN Ai-jian⁴, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-Tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China
4. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective To obtain the monoclonal antibodies against the protein of ginkgo diterpene lactones meglumine injection.

Methods After total proteins of ginkgo leaf running two-dimensional electrophoresis, the protein spots were digged and analyzed by mass spectrometry (MS). According to the result of MS, the polypeptide was synthesized and used to immunize the BALB/c mice. The indirect ELISA was utilized to develop monoclonal antibody after cell fusion between SP2/0 cells and spleen cells from the immunized BALB/c mice. **Results** The immunoglobulin subtypes of five monoclonal antibodies were IgM and light chain was Kappa identified with a commercial capture-ELISA kit. Western blotting analysis also indicated that the monoclonal antibodies were specific to the protein of ginkgo leaf. **Conclusion** The experiment would be helpful for the establishment of detection method specific to the proteins of ginkgo diterpene lactones meglumine injection in the future study.

Key words: ginkgo diterpene lactones meglumine injection; ginkgo leaf; protein; monoclonal antibody; immunogen

银杏二萜内酯葡胺注射液是以银杏叶为原料, 经提取纯化后得到其有效部位银杏二萜内酯(银杏内酯 A、B、K 等), 并以其为原料制成的注射液, 临床用于脑梗死(中风病中经络痰瘀阻络证)的治疗。由于中药注射剂具有生物提取物的特征, 在提

取的过程中不可避免地带来一些生物大分子, 比如植物蛋白、核酸等。蛋白质是抗原性最强的常见物质, 而且相对分子质量越大抗原性越强, 越容易引起过敏或类过敏反应。因此, 中药注射剂引起过敏反应的主要原因之一, 可能就是中药材中所含的植

收稿日期: 2013-03-06

基金项目: 国家“重大新药创制”——中药治疗心脑血管疾病有效成分组(群)的创新药物孵化基地(2011ZX09401-097)

作者简介: 李芳, 女, 中级职称, 硕士, 从事药物筛选及注射剂安全性评价工作。Tel: (0518)81152297 E-mail: lf198098@126.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518)85521956 E-mail: wzzh-nj@tom.com

物蛋白或有机质在人体内形成抗原,从而引发过敏反应^[1-2]。

目前中药的质量控制方面多以 HPLC 法^[3-4]为主,但需精密仪器、费时长、不适合大批量样品的快速测定。酶联免疫吸附(ELISA)法成本低、速度快、灵敏度高、仪器设备简单。张英华等^[5]应用 ELISA 法检测乳铁蛋白的量,最小检出量为 0.5 ng/mL,线性范围 0.8~100 ng/mL,与 HPLC 法相比,具有快速、简便、可同时检测几十个甚至几百个试样的优点。江荣炎等^[6]通过间接 ELISA 法检测正常大鼠不同水代谢状态下尿液中水通道蛋白-2。韩素桂等^[7]以 ELISA 法检测甲胎蛋白异质体的量,进而判断其在原发性肝癌中的诊断价值。

为了检测并控制过敏原的量,降低其临床应用的风险,本研究根据银杏二萜内酯葡胺注射液的制备工艺,以潜在的过敏原即水溶性蛋白的肽段作为免疫原,制备抗银杏二萜内酯葡胺注射液蛋白的单克隆抗体,为建立检测残留蛋白的 ELISA 方法奠定基础。

1 仪器与材料

小型垂直板电泳槽、PowerPace Basic 基础电源、小型 Trans-Blot 转印槽、PROTEAN IEF Cell 等电聚焦仪、17 cm 聚焦盘和水化盘、PDQuest 8.1 图像分析软件, Bio-Rad 公司;超低温冰箱(-70 °C), REVCO 公司; Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; LD4—2A 台式低速离心机, 湘仪离心机公司; PowerLook 2100XL 扫描仪, 美国 MMAX 公司; Infinite M200Pro 酶标仪, TECAN 公司; CO₂ 恒温培养箱, Thermo 公司; 超声波破碎仪, 宁波新芝科学仪器厂; SW—CJ—2F 型医用净化工作台, 苏州安泰空气技术公司; ND1000 超微量核酸蛋白测定仪, 美国 NanoDrop 公司; WH—861 漩涡混合器、WD—9405B 水平摇床均为北京六一仪器厂产品。

雌性 BALB/c 小鼠 5 只, 体质量 18~20 g, 扬州大学比较医学中心提供, 许可证号: SCXK(苏)2007-0001, 实验动物质量合格证号: NO0010638。银杏叶购自主产地山东郯城, 经江苏康缘药业股份有限公司质量部徐汇工程师鉴定为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶。小鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)由扬州大学兽医学院江苏省动物预防医学重点实验室提供。

次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷(HT)、次黄嘌呤氨

基碟呤和胸腺嘧啶核苷(HAT)、L-谷氨酰胺、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗鼠 IgG、碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠 IgG、50%聚乙二醇, 美国 Sigma 公司; 含高糖的 DMEM 培养基, GIBCO 公司; 免疫球蛋白标准亚类快速鉴定试剂盒, Thermo 公司; 蛋白酶抑制剂, 罗氏公司; 尿素(urea)、硫脲(thiourea)、三羟甲基氨基甲烷(tris base)、丙烯酰胺(acrylamide)、亚甲基甲叉双丙烯酰胺(methylene bisacrylamide)、十二烷基磺酸钠(SDS)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、甘氨酸(glycine), Amersham Pharmacia 公司; 二硫苏糖醇(DTT)、低熔点琼脂糖(agarose)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃)、硝酸银(AgNO₃), Sigma 公司; 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-1-丙磺酸(CHAPS)、三正丁基膦(TBP)、两性电解质(ampholyte Bio-Lyte Ph 3-10)、碘乙酰胺(iodoacetamide)、考马斯亮蓝 G-250、考马斯亮蓝 R-250、溴酚蓝(bromophenol blue)、矿物油、固定化 pH 梯度(IPG)干胶条, Bio-Rad 公司; 标准蛋白质(Marker)、预染 Marker、5×SDS 凝胶上样缓冲液, Fermentas (MBI) 公司; 碱性磷酸酶显色试剂盒(BCIP/NBT Solution)、四甲基联苯胺(TMB), AMERSCO 公司; 2-巯基乙醇、三氯乙酸(TCA)、丙酮、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100), 国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 银杏叶蛋白的制备与凝胶电泳

将-70 °C 保存的银杏叶剪碎, 加入适量液氮研磨成粉末状; 取研磨好的银杏粉末, 每 0.1 g 加入 1.5 mL 的 10% TCA-丙酮, -20 °C 2 h 后, 4 °C、12 000 r/min, 离心 1 h; 弃掉上清, 重复 1 次。加入 1.5 mL 冰浴丙酮, -20 °C 2 h, 重复此操作直到上清变为清亮, 4 °C 离心弃掉上清, 沉淀置于通风厨中风干, -70 °C 保存。取含蛋白沉淀的粉末, 水化液裂解样品: 每 0.1 g 加入 1 mL 水化液。水化液配制: 1 mL 水化液中加 6 μL 蛋白酶抑制剂, 6 μL 两性电解质及 9 mg DTT。先超声波破碎: 30 W, 间隔 5 s 破碎 1 次, 每次 4 min; 每份再分别加 5 μL 蛋白酶抑制剂, 冰浴振摇 2 h, 4 °C、12 000 r/min, 离心 1 h, 取上清。以 Bradford 方法进行蛋白定量^[8], 提取蛋白质量浓度在 7.4 mg/mL 左右。

十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳: 取水化液裂解的上清, 分别加入 5×SDS 凝胶上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min; 每孔上样

35 μ L, 80 V 20 min, 120 V 80 min 进行总蛋白的分离。结果见图 1, 在相对分子质量 14 400~116 000 能观察到较多清晰的条带。

2.2 二维电泳、质谱分析与多肽合成

2 次二维电泳 (2-DE): 采用 17 cm、pH 5~8 的 IPG 胶条, 将水化液裂解的总蛋白上样, 上样量分别为 200、300 μ g, 用水化液稀释到总体积为 300 μ L。聚焦结束后取出 IPG 胶条, 进行胶条平衡和第 2 向凝胶电泳。起始电流为 10 mA, 待样品完全走出 IPG 胶条, 再加大电流至 20~30 mA, 当溴酚蓝指示剂到底部边缘时即可停止电泳。参照 Candiano 介绍的胶体考染方法^[9]进行考染。2 次 2-DE 图见图 2。第 1 次 2-DE 蛋白上样量为 200 μ g, 由图 2-A 可知量较高的点偏少。

将 2 次 2-DE 以扫描仪扫描, 光学分辨率设置为 600 dpi 进行透射扫描, 数字化图象文件运用 PD Quest 2D Analysis (Version 8.1) 软件进行一系列操

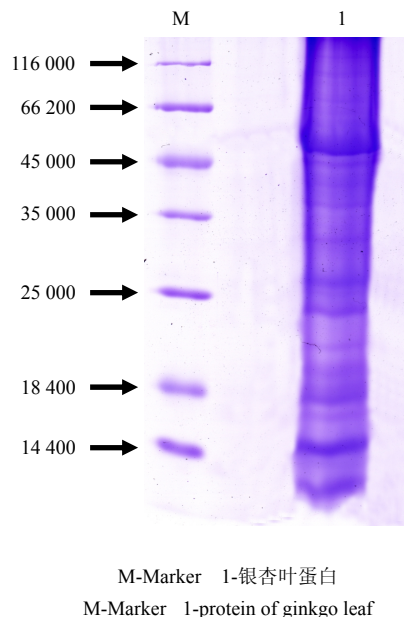


图 1 银杏叶总蛋白的 SDS-PAGE
Fig. 1 SDS-PAGE of total proteins in ginkgo leaf

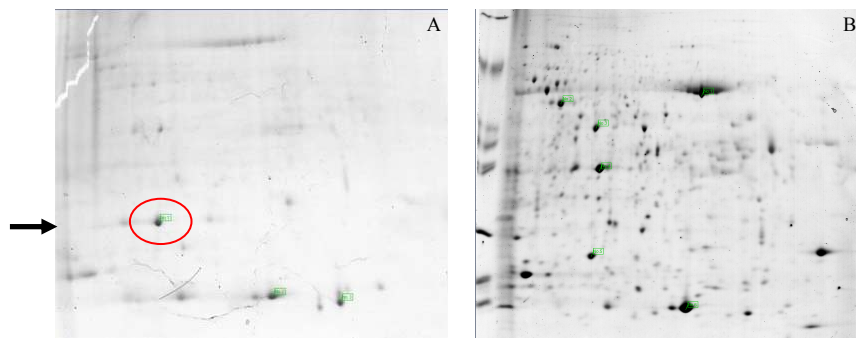


图 2 银杏叶总蛋白第 1 次 (A) 和第 2 次 (B) 2-DE 图
Fig. 2 Primary (A) and second (B) 2-DE of total proteins in ginkgo leaf

作分析。取相关蛋白点, 由广州慧晶生物公司进行质谱分析。

根据质谱分析结果 (图 3), 选取第 1 次 2-DE 所取蛋白点 (图 2 中椭圆圈标示处) 中的部分肽段 (LRLEDLRIPPAYSKTFQ) 进行多肽合成, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。以 DNASTar 软件^[10]分析得出此肽段抗原指数为 0.3-0.6-0.3-0.75-0.75-1.15-0.93-0.86-1.49-1.92-2.8-1.52-1.24-0.96-1.28-1; 亲水指数最高 1.43。

2.3 单抗制备

选取 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 用多肽与弗氏佐剂乳化溶液腹腔免疫注射, 间隔 14 d 1 次, 免疫 3 次, 免疫剂量为 50 μ g/只; 融合前加强免疫为 100 μ g/只。

取效价好的小鼠进行加强免疫, 72~96 h 后取脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行细胞融合。建立多

肽为免疫原的间接 ELISA 法筛选方法^[11], 用 1 μ g 多肽/孔包被进口酶标板、37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h 包被。经过筛选、有限稀释法进行多次克隆后, 筛选到 5 株效价与特异性均较好的单克隆细胞株, 分别命名为抗银杏叶蛋白单抗-1d6、1e7、5h9、6h9、6e10。

2.4 单抗的生物学鉴定

采用 Thermo 公司的免疫球蛋白标准亚类快速鉴定试剂盒对单抗亚类进行鉴定。结果抗银杏叶蛋白单抗-1d6、1e7、5h9、6h9、6e10 的亚类均为 IgM, 轻链类型均为 Kappa 链。

Western-blotting 分析: 先将银杏叶总蛋白上样进行电泳, 结束后, 将凝胶切割, 在转移缓冲液中按 50 V 2.5 h 进行转移, 然后分别与各单抗的细胞上清进行印记分析。结果见图 4, 表明 5 株抗银杏叶蛋白单克隆抗体反应性好。

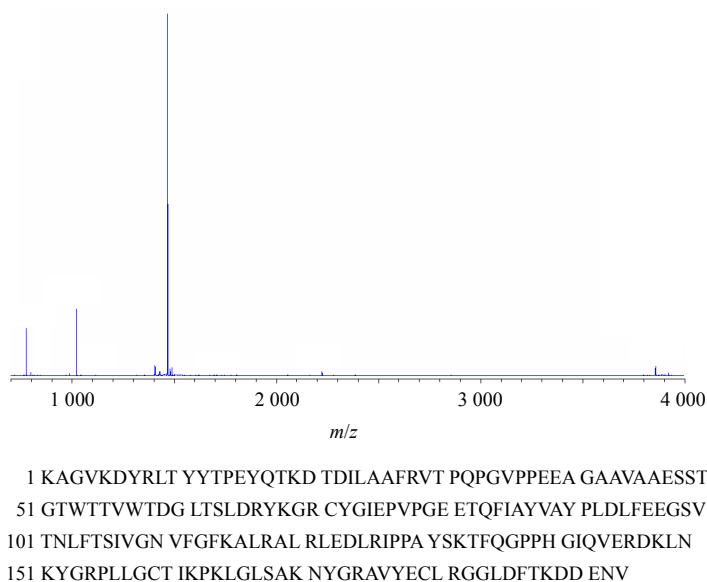


图3 图2-A中蛋白点的肽指纹图谱

Fig. 3 Peptide mass fingerprinting of protein spot of Fig. 2-A

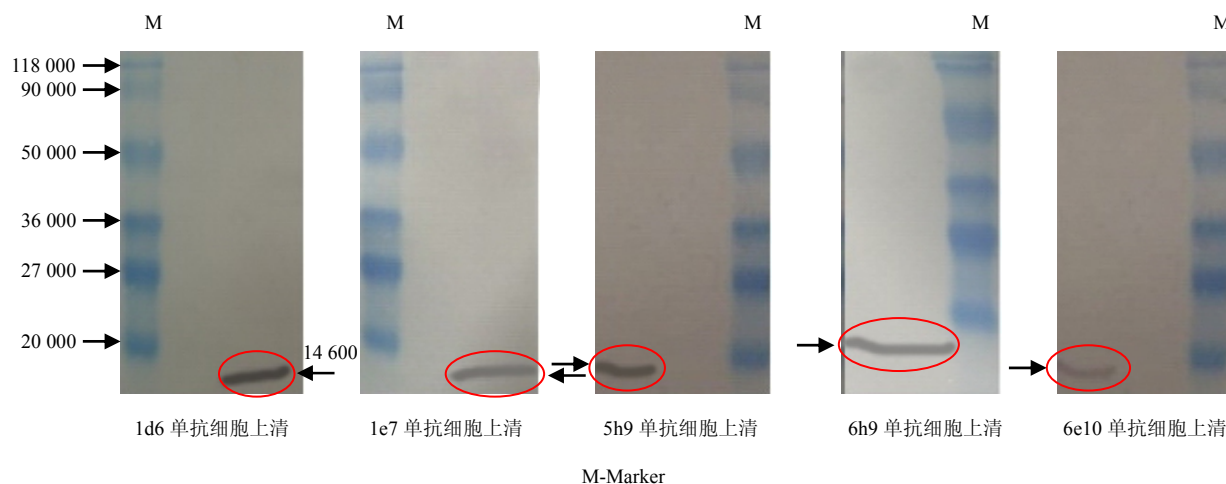


图4 5株单抗的Western blotting分析

Fig. 4 Western blotting analysis of five monoclonal antibodies

3 讨论

银杏二萜内酯葡胺注射液处方只含银杏叶一种药材，根据其制备工艺可知，制剂中如有残留蛋白应该为水溶性蛋白。从 SDS-PAGE 结果可以看出，TCA-丙酮法提取的蛋白种类较多，想得到纯度高的蛋白难度很大。第1次 2-DE 上样量低、丰度高的蛋白点偏少，但是若有残留蛋白，则浓度高的蛋白可能性更大，因此加大总蛋白上样量，在 2 次 2-DE 后，取相关蛋白点进行质谱分析，经过 DNASTar 软件分析并比较后合成抗原性及水溶性较好的多肽用于小鼠免疫。

自从 1975 年 Kohler 和 Milstein 首创淋巴细胞

杂交瘤技术制备单克隆抗体以来^[12]，该技术作为一种成熟的常规技术已广泛应用于生物科学的各个领域。然而，要获得高质量的单抗并非易事，抗原质量、免疫程序、筛选方法等诸多因素均与单抗的质量有关。本实验经过 2 次细胞融合，第 1 次融合筛选到的阳性孔在第 1 次克隆之后转为阴性，应该是杂交瘤细胞中阴性细胞较多且生长过快，从而抑制了阳性细胞的生长。第 2 次细胞融合后获得了 5 株单抗，由于初次免疫应答一般使小鼠分泌 IgM 抗体，2 次免疫应答分泌 IgG 抗体，此次获得的单克隆抗体亚类鉴定均为 IgM，估计与多肽相对分子质量大小、免疫时间间隔有关。

Western blotting 分析发现本研究制备的 5 株单克隆抗体具有强反应性、稳定性, 由于单抗亚类属 IgM, 在使用上有一定的局限性, 但不可否认, 其对银杏二萜内酯葡胺注射液残留蛋白检测方法的建立具有重要的借鉴意义。

参考文献

- [1] 段为钢. 中药注射剂安全性的技术思考 [J]. 云南中医学院学报, 2009, 32(6): 12-13.
- [2] 郑彦云, 陆平平, 吴志红, 等. 84 例中药注射液不良反应及相关因素分析 [J]. 广东药学, 2003, 13(4): 53-55.
- [3] 李家春, 孙 兰, 李红娟, 等. 桂枝茯苓胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1333-1335.
- [4] 刘 志, 阮长春, 刘天志, 等. HPLC 法同时测定林下参、鲜人参、生晒参和红参中 14 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2431-2434.
- [5] 张英华, 迟玉杰, 董 平. 酶联免疫法测定牛乳中乳铁蛋白含量 [J]. 中国乳品工业, 1999, 27(6): 19-20.
- [6] 江荣炎, 许顶立, 赖文岩, 等. 间接酶联免疫吸附法定量检测大鼠尿液水通道蛋白-2 浓度 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2005, 7(4): 260-262.
- [7] 韩素桂, 黄彩云, 刘洪梅, 等. 酶联免疫吸附法检测甲胎蛋白异质体对原发性肝癌的诊断价值 [J]. 华西医学, 2012, 27(6): 44-46.
- [8] 王文华, 杨志和, 臧文生, 等. 螺旋霉素中蛋白含量的测定方法 (Bradford) 及验证 [J]. 广州化工, 2010, 38(4): 137-138.
- [9] Candiano G, Bruschi M, Musante L, *et al.* Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [10] 黎 明, 于天飞. DNASTar 软件在动物病毒研究中的应用实例 [J]. 高师理科学刊, 2010, 30(3): 61-63.
- [11] 赵伟栋, 韩文瑜, 江森林, 等. 牛布氏杆菌特异性抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(12): 1244-1250.
- [12] Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(5517): 495-497.