

• 药剂与工艺 •

绿原酸人工抗原的合成及多克隆抗体的制备

薛瑾^{2,3}, 屈会化^{1,3*}, 孙晔^{2,3}, 张越^{2,3}, 王雪茜^{2,3}, 续洁琨^{2,3}, 赵琰^{2,3*}, 王庆国^{2,3*}

1. 北京中医药大学 科研实验中心, 北京 100029

2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029

3. 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 合成绿原酸(chlorogenic acid, CHA)人工抗原, 制备CHA多克隆抗体, 为制备过敏成分分析的免疫芯片奠定基础。方法 采用碳二亚胺法分别合成CHA免疫抗原(CHA-牛血清白蛋白)和包被抗原(CHA-卵清蛋白); UV法和TLC法鉴定人工抗原偶联是否成功; 间接ELISA方法检测免疫小鼠血清中抗体效价; 间接竞争ELISA方法检测抗体特异性。结果 经UV法和TLC法检测, CHA与BSA偶联成功。血清抗体效价为1:128 000, CHA-PAbs的质量浓度与抑制率的线性方程为 $Y = -0.10 \ln X + 1.158$, 线性检测范围为15.6~250 ng/mL, $R^2 = 0.995$, 并且和甘草酸、黄芩苷等与其常配伍应用的中药化合物均无交叉反应。结论 成功制备了灵敏度高、特异性好的CHA多克隆抗体, 为CHA的微量检测和过敏性研究提供了实验依据。

关键词: 绿原酸; 人工抗原; 多克隆抗体; 碳二亚胺法; 免疫分析

中图分类号: R284.3 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)04-0480-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.006

Synthesis of artificial chlorogenic acid antigen and preparation of polyclonal antibodies

XUE Jin^{2,3}, QU Hui-hua^{1,3}, SUN Ye^{2,3}, ZHANG Yue^{2,3}, WANG Xue-qian^{2,3}, XU Jie-kun^{2,3}, ZHAO Yan^{2,3}, WANG Qing-guo^{2,3}

1. Center of Scientific Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. "Classical Prescription Application Foundation Research" Innovation Team, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To synthesize artificial chlorogenic acid (CHA) antigen, to prepare CHA polyclonal antibody, and to lay the foundation for the preparation of immune chip for allergic component analysis. **Methods** CHA-bovine serum albumin (CHA-BSA) and CHA-ovalbumin (CHA-OVA) were synthesized by carbodiimide 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 determination, the CHA was successfully conjugated with BSA. The serum antibody titer was 1:128 000 with the linear range of 15.6—250 ng/mL, $R^2 = 0.995$, and $Y = -0.10 \ln X + 1.158$. No cross-reaction was detected with glycyrrhizic acid, parietic acid and so on, which were commonly used in the combination with CHA. **Conclusion** The preparation of multi-clonal antibody with good sensitivity and specificity against CHA is successful, which provides a foundation for the trace detection and allergy research of CHA.

Key words: chlorogenic acid; artificial antigen; polyclonal antibody; carbodiimide method; immune analysis

收稿日期: 2013-10-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274043, 81373542); “重大新药创制”国家专项课题(2010ZX09502-002)

作者简介: 薛瑾(1986—), 女, 江苏连云港人, 在读博士, 主要从事经典方剂的应用基础研究。E-mail: bingstea@163.com

*通信作者 屈会化(1966—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为中药免疫分析技术。Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihua@gmail.com

赵琰(1973—), 女, 研究员, 博士, 研究方向为中药免疫分析技术。Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@gmail.com

王庆国(1952—), 男, 教授, 博士, 研究方向为经典方剂的现代应用与基础研究。

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

绿原酸(chlorogenic acid, CHA)具有抗氧化、抗炎、抗菌等多方面的药理作用^[1-2],是清开灵、热毒宁、双黄连、鱼腥草、茵栀黄等中药注射剂中的主要有效成分之一。但近年来,有学者认为CHA可能是引起上述中药注射剂不良反应的主要原因^[3]。动物实验也证明,CHA可以作为一种半抗原刺激小鼠产生免疫应答并引发过敏反应^[4]。为探讨CHA是否与中药注射剂的临床过敏反应相关,本研究团队提出了利用免疫芯片法分析确认中药注射剂过敏成分的新思路^[5]。免疫芯片法具有简洁快速、灵敏度高、重复性好、检测容量大、前处理简单等特点,不仅可用于过敏成分的追踪分析,也可用于研究复方作用机制、物质基础、质量控制等方面,越来越引起关注^[6]。

免疫芯片制备的核心是获取相应的中药小分子抗体,以及可特异性结合抗体的人工包被原。本实验通过碳二亚胺法将CHA与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联,得到CHA的免疫抗原(CHA-BSA)和包被抗原(CHA-OVA),采用UV法和TLC法对合成的抗原进行了鉴定,并免疫Balb/c小鼠,制备出CHA多克隆抗体,为免疫芯片法的建立奠定了基础。

1 材料

CHA购自南京泽朗医药科技有限公司,质量分数95%(HPLC);BSA(批号29180102100)购自美国Genview公司;卵清蛋白(OVA,批号115K0730)购自北京欣经科生物技术有限公司;水溶性碳二亚胺盐酸盐(EDC-HCl,批号5003V09W)购自阿法埃莎(天津)化学有限公司;弗氏完全佐剂(FCA,批号F5881)、弗氏不完全佐剂(FICA,批号F5506),购自美国Sigma公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB,批号0759),购自美国Amresco公司;酶标二抗(HRP-标记羊抗鼠IgG,批号RPN4201),购自美国GE Healthcare公司;透析袋(截留相对分子质量8 000~14 000),北京索莱宝科技有限公司。

SPF级健康雌性Balb/c小鼠,8~10周龄,购自北京维通利华公司,动物许可证号:SCXK-(京)2007-004,实验动物质量合格证号:No.0029729。

Beckman CoulterDU800紫外可见分光光度计,购自德国Beckman公司;Thermo MK3型酶联检测仪,购自美国Thermo公司;84-1A磁力搅拌器,购自上海司乐仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 人工免疫原和包被原的合成

2.1.1 免疫原的合成 称取CHA 20 mg, EDC-HCl 12 mg, 溶解于2 mL PBS中,称为A液。称取BSA 20 mg充分溶于0.4 mL PBS中,称为B液。将A液逐滴加入B液中,并于反应体系中加入4% NaHCO₃调pH值至6.8,室温下(22℃)避光搅拌反应4 h。反应结束后用pH 6.8的CBS透析48 h,每6小时换液1次,得到CHA-BSA。透析后的产物分装,-20℃保存,待用。

2.1.2 包被抗原的合成 方法与人工抗原基本相同。称取CHA 10 mg, EDC-HCl 5 mg, 溶解于1 mL PBS中,称为A液。称取OVA 10 mg溶于0.4 mL PBS中,称为B液。然后将A液逐滴加入B液中。调节pH值至6.8,室温下(22℃)避光搅拌反应4 h。将制备好的免疫原用pH 6.8的CBS透析48 h,每6小时换液1次,得到CHA-OVA,4℃保存待测。

2.2 紫外扫描鉴定

配制适宜浓度的CHA、BSA与OVA标准溶液,用紫外分光光度计在190~700 nm进行紫外扫描,测出CHA、BSA、OVA、CHA-BSA、CHA-OVA的全波长图谱及最大吸收波长处的吸光度(A)值。

图1、2为CHA、BSA、OVA、CHA-BSA、CHA-OVA紫外分光光度计扫描结果。其中,CHA $\lambda_{\max}$ = 323.8 nm, BSA $\lambda_{\max}$ = 278.5 nm。CHA-BSA、CHA-OVA与BSA在 $\lambda = (323.8 \pm 20.0)$ nm光谱特征明显不同,具有CHA和BSA、OVA叠加的特点。由于合成产物经充分透析后完全排除了未结合蛋白的CHA小分子,根据UV吸收的叠加性原理可知,CHA-BSA、CHA-OVA的吸收光谱是CHA的吸收光谱与BSA、OVA吸收光谱的整合,说明CHA已经与载体蛋白偶联成功。

根据文献报道的方法^[7],以下列公式计算CHA-BSA的偶联率: $C_a/C_b = (A_{\text{CHA-BSA } 324 \text{ nm}} \times K_{\text{BSA } 278 \text{ nm}} - A_{\text{CHA-BSA } 278 \text{ nm}} \times K_{\text{BSA } 324 \text{ nm}}) / (A_{\text{CHA-BSA } 278 \text{ nm}} \times K_{\text{CHA } 324 \text{ nm}} - A_{\text{CHA-BSA } 324 \text{ nm}} \times K_{\text{CHA } 278 \text{ nm}})$,其中K为吸光系数,C为各物质的物质的量浓度,则 $K = A/C$ 。估算BSA与CHA偶联数目为3.2:1。

2.3 TLC 鉴定

TLC法是鉴定人工抗原较为简捷的方法。按《中国药典》2010年版方法进行。用蒸馏水配制适宜质量浓度的CHA对照品溶液和BSA、OVA标准溶液,将已透析的CHA-BSA、CHA-OVA和未透析

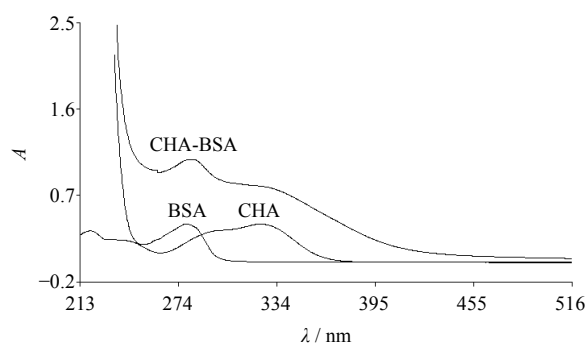


图 1 CHA、BSA 和 CHA-BSA 的 UV 全波长图谱

Fig. 1 Full wavelength UV spectra of CHA, BSA, and CHA-BSA

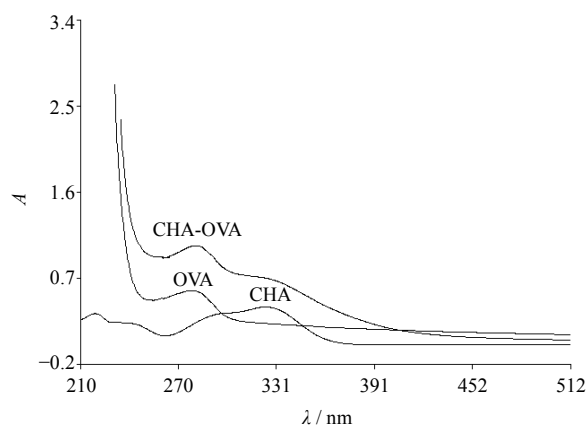


图 2 CHA、OVA 和 CHA-OVA 的 UV 全波长图谱

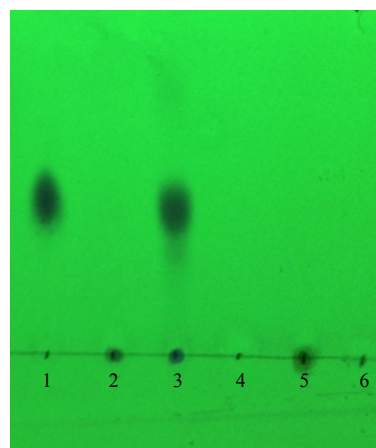
Fig. 2 Full wavelength UV spectra of CHA, OVA, and CHA-OVA

的 CHA-BSA 用蒸馏水稀释到适宜质量浓度。将 6 个样品分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以醋酸乙酯-丙醇-甲酸-水 (7:3:1:1.2) 为展开剂, 展开后晾干, 用 10% 硫酸-乙醇溶液显色, 置紫外光灯 (365 nm) 下检视。

图 3 为薄层色谱结果, 可以看出 CHA 的 Rf 值约为 0.68, 并显现浅棕色斑点; BSA、OVA 的 Rf 为 0, 停留于原点位置, 也未显现浅棕色斑点; 未透析的 CHA-BSA 样品中包含偶联物、BSA 以及未与 BSA 偶联的游离 CHA, 故在原点及相应位置均显色; 已透析的 CHA-BSA、CHA-OVA 样品中已无 CHA, 只含有偶联物及载体蛋白, 故仅在原点位置显现浅棕色斑点, 该结果说明, CHA 与 BSA、OVA 的偶联是成功的。

2.4 抗体的制备

选用雌性 Balb/c 小鼠。首次免疫用无菌水稀释适量的免疫抗原, 与等量的弗氏完全佐剂充分混匀乳化, 免疫剂量 100 μg/只。采用背部皮下多点免疫



1-CHA 2-CHA-BSA (已透析) 3-CHA-BSA (未透析)
4-BSA 5-CHA-OVA (已透析) 6-OVA
1-CHA 2-CHA-BSA (dialyzed) 3-CHA-BSA (not dialyzed)
4-BSA 5-CHA-OVA (dialyzed) 6-OVA

图 3 CHA-BSA 和 CHA-OVA 的 TLC 图 (365 nm)

Fig. 3 TLC of CHA-BSA and CHA-OVA (365 nm)

动物 (0.1 mL/只)。以后改用弗氏不完全佐剂乳化抗原, 每 14 天经 sc 加强免疫 1 次, 免疫剂量相同。从第 3 次免疫起, 每次免疫 7 d 后小鼠尾静脉采血, 分离血清, 间接 ELISA 法测效价。在最后一次大量采血前 2 d 再以相同剂量 (不加佐剂) 腹腔冲击免疫 1 次^[8-9]。采用饱和硫酸铵沉淀法对得到的血清进行纯化^[7], 获得纯化后的抗 CHA 特异性多克隆抗体 (polyclonal antibodies, PAb) ——CHA-PAb。

2.5 CHA-PAb 的效价测定

采用间接 ELISA 方法测定 CHA-PAb 的效价。以 CHA-OVA 作为包被原, 用蒸馏水稀释至 1 μg/mL, 在 96 孔板中每孔加入 100 μL, 37 °C 温育 1 h, 洗板。每孔加脱脂奶粉 200 μL 封闭, 37 °C 孵育 2 h, 洗板。将 CHA-PAb 按倍比稀释成 1 000、2 000、4 000、8 000、16 000、32 000、64 000、128 000、256 000 倍。每孔加入 100 μL, 同时以小鼠免疫前的阴性血清作对照, 各设 3 个复孔。37 °C 温育 1 h, 洗板, 每孔加入 100 μL HRP-羊抗鼠 IgG (1:10 000), 37 °C 温育 30 min, 洗板, 每孔加 100 μL TMB 工作液, 避光反应 15 min, 2 mmol/L 硫酸 50 μL 终止, 测定 A₄₉₀ 值。以样品 (P) 与阴性血清 (N) A₄₉₀ 比值大于 2.1 时定义为阳性, CHA-PAb 为阳性的最大稀释倍数的倒数定义为 CHA-PAb 的效价。

CHA-PAb 的稀释倍数和 P/N 值见表 1。当 P/N 值 ≥ 2.1 时认为结果为阳性, 可见 CHA-PAb 的效价为 1:128 000。

表 1 间接 ELISA 法测定 CHA-PAbs 的效价
Table 1 Titer of CHA-PAbs determined by I-ELISA

稀释倍数	P/N	稀释倍数	P/N	稀释倍数	P/N
1 000	15.19	8 000	9.23	64 000	4.41
2 000	14.09	16 000	5.50	128 000	2.16
4 000	10.81	32 000	4.39	256 000	1.26

2.6 CHA-PAbs 的竞争抑制曲线

采用间接竞争 ELISA 方法测定 CHA-PAbs 的竞争抑制曲线。酶标板包被、封闭后,将 1.000 μg/mL 的 CHA 对照品溶液用 PBS 倍比稀释为 8 个质量浓度 (7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000 ng/mL),每孔加 50 μL,对照孔给予 50 μL PBS。各孔加入 50 μL 的 CHA-PAbs (1:2 000) 混合,其余方法与间接 ELISA 基本一致。以对照孔的 A_{490} 值为 A_0 ,各质量浓度对应孔的 A_{490} 值为 A ;以 A/A_0 值为纵坐标 (Y),相应的 CHA 质量浓度 (X) 的自然对数为横坐标,绘制 CHA-PAbs 的竞争抑制曲线。

图 4 为 CHA 在 7.8~1 000 ng/mL 时 CHA-PAbs 的质量浓度与抑制率的线性关系曲线。计算得到线性范围为 15.6~250 ng/mL,回归方程为 $Y=-0.10 \ln X+1.158$, $R^2=0.995$ 。

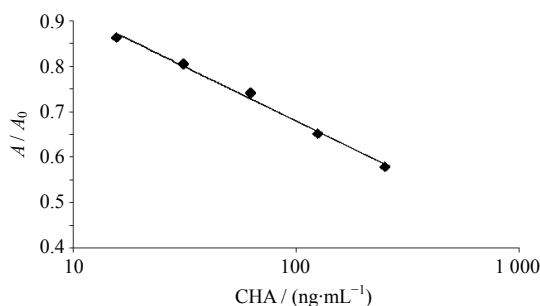


图 4 CHA 质量浓度与抑制率的线性关系曲线

Fig. 4 Linear relationship curve of inhibitory rate and CHA concentration

2.7 CHA-PAbs 的特异性检测

采取间接竞争 ELISA 的方法测定 CHA-PAbs 的特异性,方法同“2.5”项。选择甘草酸、大黄酸、丹酚酸 B、胆酸、去氧胆酸、栀子苷、黄芩苷、葛根素、芍药苷等常与金银花等含 CHA 中药配伍使用的其他中药主要成分,将 9 种化合物倍比稀释成一系列质量浓度梯度替代 CHA 稀释液。其他条件相同,测定它们与 CHA-PAbs 之间的交叉反应。计算各个化合物的 IC_{50} (IC_{50} 值定义为样品孔 A_{490} 值为对照孔 A_{490} 值一半时对应的化合物的质量浓度)。

根据下列公式计算交叉反应率^[10]。

$$\text{交叉反应率} = \text{CHA 标准品的 } IC_{50} / \text{类似物 } IC_{50}$$

CHA-PAbs 与中药小分子的交叉反应率计算结果见表 2,由此可知,CHA-PAbs 与常用中药的有效成分间交叉反应率<0.01%,均无交叉反应。

表 2 CHA-PAbs 与中药小分子的交叉反应率
Table 2 Cross-reaction rate of CHA-PAbs and small molecule of Chinese medicines

化合物	交叉反应率 / %	化合物	交叉反应率 / %
CHA	100	丹酚酸 B	<0.01
甘草酸	<0.01	黄芩苷	<0.01
胆酸	<0.01	芍药苷	<0.01
去氧胆酸	<0.01	栀子苷	<0.01
大黄酸	<0.01	葛根素	<0.01

3 讨论

当前,中药注射剂的安全性引起广泛关注^[11-12]。然而,中药注射剂中 99%以上为小分子化合物,其中的致敏成分,极有可能是半抗原,需要在体内与大分子结合成抗原才能引起变态反应^[4]。同时,致敏成分的结构、含量、来源等也有多种。因此,建立从中药注射剂中分离过敏成分的方法,从中药注射剂这一复杂多组分体系中分离寻找小分子半抗原或致敏成分,进而建立相应的特异性诊断方法,是中药注射剂乃至全部中药复方新药研究过程中亟需解决的一个重要的方法学问题。免疫芯片技术是一种适合检测多组分抗原或半抗原的新技术^[13],适合中药注射剂多组分体系小分子半抗原或致敏成分的鉴定、判断及分离寻找,实现这一方法学的关键是获取能与中药小分子成分特异性结合的人工抗体与相应的包被原。

CHA 与清开灵、热毒宁、双黄连、鱼腥草、茵栀黄等中药注射剂过敏反应与的关联性已引起人们广泛的重视^[14]。但 CHA 是小分子化合物,与蛋白等大分子不同,不能直接包被于目前常用的芯片固相载体上;CHA 也不具备免疫原性,需要与大分子载体偶联后,才能作为免疫原制备抗血清及单克隆抗体,以验证相关免疫芯片的稳定性、准确性和灵敏度等。

CHA 分子结构中含有羧基基团。对于含羧基的半抗原与载体的偶联方法包括混合酞酐法、活泼酯法及碳二亚胺法等。本实验采用了碳二亚胺法,并采用 TLC 法^[15]和 UV 法进行了人工抗原的鉴定。

结果显示,CHA成功偶联到BSA和OVA上,平均偶联比为3.2:1,偶联比较低。CHA是对光、湿不稳定的化合物^[16],同时偶联比也受到pH值^[17]、温度^[18]、浓度等多种因素的影响。因此,合成过程中CHA的结构可能发生了改变,进而影响了偶联比。但有研究证明,连接过多的半抗原并不一定能得到预期的免疫效果,半抗原与载体的偶联比存在最佳范围^[19],这是因为载体上覆盖的半抗原分子过多时,可能不利于载体与淋巴细胞表面结合并引起免疫反应。

本实验获得的多克隆抗体效价为128 000,说明CHA-BSA有效的激活了小鼠的免疫应答,也从另一方面说明偶联比等化学指标并不能很好地说明人工抗原的免疫学特征。因此,评价人工抗原是否成功关键在于其是否能够刺激机体产生抗体,以及抗体的特异性。

本实验获得的抗CHA多克隆抗体,线性范围为15.6~250 ng/mL,灵敏度较高,并与甘草酸、大黄酸、胆酸等中药小分子之间无交叉反应,也显示出较好的特异性,从而为CHA免疫芯片的制备以及CHA免疫分析方法的建立奠定了基础。

参考文献

- [1] 刘颖,郭明晔,白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材,2012,35(7): 1180-1185.
- [2] 赵金娟,戴雪梅,曲永胜,等. 绿原酸药效学研究进展[J]. 中国野生植物资源,2013,32(4): 1-5.
- [3] 袁强,王莉,成炭,等. 国家基本药物目录(2004年版)33种中药注射剂不良反应/不良事件文献分析[J]. 中国循证医学杂志,2010,10(2): 132-139.
- [4] 何洲,屈会化,王雪茜. 绿原酸作为半抗原的致敏性研究[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(10): 667-669.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 吴玉苹,王宾,王自良,等. 沙丁胺醇免疫原的合成与鉴定[J]. 河北农业科学,2010(5): 114-116.
- [8] Sakata R, Shoyama Y, Murakami H. Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, Forskolin [J]. *Cytotechnology*, 1994, 16(2): 101-108.
- [9] Shelver W L, Smith D J, Berry E S. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-adrenergic agonist actopamine [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(9): 4020-4026.
- [10] Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures [J]. *Methods Enzymol*, 1981, 73(Pt B), 3-46.
- [11] 王倩,张艳丛,解丽君,等. 我国1990—1999年中药不良反应的文献分析[J]. 中国药房,2000,11(5): 226-228.
- [12] 张岷,屈哲,霍桂桃,等. 中药注射剂诱发过敏性反应的临床前安全性评价[J]. 药物评价研究,2013,36(4): 241-244.
- [13] 康熙雄. 免疫芯片[J]. 齐鲁医学检验,2005,16(3): 3-5.
- [14] 李饮,张信岳,陈国神. 含绿原酸的清热解毒类中药注射剂不良反应及其机理探讨[J]. 中国现代应用药学杂志,2009,26(7): 555-558.
- [15] 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.
- [16] Wrobel N, Schinkinger M, Mirsky V M. A novel ultraviolet assay for testing side reactions of carbodiimides [J]. *Anal Biochem*, 2002, 305(2): 135-138.
- [17] Celej M S, Montich G G, Fidelio G D. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility [J]. *Protein Sci*, 2003, 12(7): 1496-1506.
- [18] 江滨,王风云,曾元儿,等. 绵茵陈药材提取液中绿原酸稳定性影响因素考察[J]. 中成药,2007,29(3): 359-362.
- [19] Schneider P, Hammock B D. Influence of ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for the S-triazine herbicides using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40(3): 525-530.