

## · 专 论 ·

## 中药小分子单克隆抗体技术平台的构建

屈会化, 赵 琰\*, 王庆国\*

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:** 抗体是现代生命科学研究中极其重要的工具, 小分子抗体技术在中医药研究领域具有广阔的应用前景。结合创新团队开展的研究工作, 介绍了中药小分子单克隆抗体技术平台建立的背景和抗体制备的技术难点, 针对基于中药小分子单克隆抗体的技术产品, 如 ELISA 检测试剂盒、免疫亲和色谱柱、胶体金试纸、荧光标记抗体和抗体芯片等, 探索实践了其在中医药研究领域中的多种应用, 并对中药小分子单克隆抗体技术的科学意义和应用价值进行了展望。

**关键词:** 中药小分子; 单克隆抗体制备; 酶联免疫吸附法; 免疫亲和色谱柱; 胶体金试纸; 荧光标记抗体; 抗体芯片

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)07 - 0895 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.001

## Establishment of small molecular monoclonal antibody technology platform in Chinese materia medica

QU Hui-hua, ZHAO Yan, WANG Qing-guo

“Classical Prescription Application Foundation Research” Innovation Team, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract:** Antibody is a tool of vital importance in modern bioscience research, small molecular antibody technology has a broad application prospect in the field of receptor binding analysis, enzyme assays, and quantitative and/or qualitative analytical techniques of Chinese materia medica (CMM) research. In this paper, combining with the research work carried out by our innovation team, we introduced the establishment background of the small molecular monoclonal antibody technology platform in CMM and technical difficulties in antibody preparation. In view of the technology products based on small molecular monoclonal antibody of CMM, such as ELISA test kit, immune affinity chromatography column, colloidal gold test paper, fluorescently labeled antibodies, and antibody microarrays, we explored and practised the various applications based on the small molecular monoclonal antibody technology looking forward to its scientific significances and application values in the field of CMM research.

**Key words:** small molecules of Chinese materia medica; monoclonal antibody preparation; enzyme-linked immunosorbent method; immune affinity chromatographic column; colloidal gold test paper; fluorescently-labeled antibodies; antibody microarrays

抗体 (antibody) 是现代生命科学研究领域极其重要的工具, 假若没有抗体, 对蛋白质和基因的研究不会取得如此巨大的进展。利用小分子抗体建立的免疫分析方法具有特异性强、灵敏度高、不依赖大型设备等特点, 已经在毒品现场快速检测等多个领域获得广泛应用。由于其突出的技术特点, 近年来将小分子

抗体技术用于中医药研究越来越引起关注。

2007 年至今, 本团队一直致力于中药小分子单克隆抗体制备与应用技术的研究, 已获得多种结构类型的中药小分子单抗, 并将其用于中药质量控制及体内代谢研究、免疫亲和色谱柱的制备、过敏成分的分析等多个方面, 取得较大进展。为此, 本文

收稿日期: 2013-12-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81274043, 81373542)

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

根据前期的研究成果较系统地介绍了中药小分子单克隆抗体技术平台建立的背景和抗体制备与应用的技术关键点与难点。

## 1 小分子单克隆抗体技术

### 1.1 单克隆抗体技术

抗体(antibody)是指机体的免疫系统在抗原刺激下,由B淋巴细胞或记忆细胞增殖分化成的浆细胞所产生,可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白,主要分布在血清中,也分布于组织液及外分泌液中。常规抗血清来自体内产生的不同细胞克隆,是多克隆抗体。1975年,英国剑桥皇家医学研究委员会分子生物学实验室的Kohler和Milstein成功利用细胞杂交方法,分离出能够产生针对特定抗原的抗体分泌细胞,可在体外长期传代并分泌特异性抗体。这些细胞经过克隆化形成单克隆细胞,能产生针对某一特定抗原决定簇的完全相同的纯净抗体,即单克隆抗体(monoclonal antibody),简称单抗<sup>[1]</sup>。

单抗由同一个B细胞克隆产生,与多克隆抗体相比,具有纯度高、特异性强、重复性好、不含其他抗体污染,且能持续大量供应的优点。单克隆抗体技术的问世,不仅带来了免疫学领域里的一次革命,而且为所有需要制备和使用特异性抗体的研究领域提供了全新的手段和工具,在生物及医学科学的各个领域获得了极广泛的应用,促进了众多学科的发展,Kohler和Milstein也因此荣获1984年诺贝尔医学和生理学奖。

### 1.2 小分子单克隆抗体技术

相对于蛋白类大分子,作为半抗原小分子化合物不能直接在体内产生抗体,需要与相对分子质量大的载体(一般为蛋白质)以共价键相偶联制备成人工抗原,以人工抗原免疫动物,使动物的免疫系统发生应答反应,才能产生具特异性的抗体。由于在制备过程中涉及的学科更多、更困难,小分子单克隆抗体技术的发展相对较慢。

20世纪20年代,奥地利免疫化学家Landsteiner创建了人工抗原合成方法,为此后小分子化合物人工抗原的合成及单克隆抗体制备奠定了基础。其基本方法:将小分子与牛血清蛋白等大分子偶联后制成人工抗原,然后免疫动物,相应细胞融合后,筛选出阳性克隆,进而制备特异性结合某小分子的单克隆抗体。该过程的关键在于小分子半抗原的偶联,目前国内外学者已建立了多种合成方法,如碳二亚胺法和活泼酯法等<sup>[2]</sup>。小分子单克隆抗体的制备技

术已经成熟,基于单克隆(或多克隆)抗体的小分子免疫分析方法已进行了较为全面的研究<sup>[3]</sup>,并在食品农药残留、环境监测、毒品快速测定中得到初步应用,已实现测定含量在飞摩尔水平以下的小分子半抗原<sup>[4-7]</sup>。

## 2 中药小分子单克隆抗体制备技术

中药或中药复方活性成分90%以上为小分子(相对分子质量 $<2500$ ),其单克隆抗体制备的技术路线与其他小分子化合物并无实质差异。但是,中药成分类型多样、结构复杂,需要建立多种相应的偶联技术。另外,中药中某个活性成分,往往存在多个同源性的化合物。其中一个成分的抗体,与其他成分可能会产生交叉反应,造成测定结果的差异。特别是异构体化合物,如绿原酸具有多个异构体,它们之间的交叉反应强烈,需要建立更为特异的克隆筛选技术。因此,相对于单一成分的化学药物,中药小分子单克隆抗体在人工抗原的合成方法上有较高的要求<sup>[2]</sup>,筛选获得中药小分子单克隆抗体细胞株,建立相应的免疫分析检测方法也有其特殊性。

### 2.1 中药小分子单克隆抗体制备技术的关键环节

从2007年开始,本团队致力于中药小分子单抗的研究,克服多种困难,解决了中药小分子单克隆抗体制备过程中的6个关键技术环节:①人工抗原与包被原的合成及鉴定技术;②人工抗原免疫技术;③骨髓瘤细胞杂交及阳性单克隆细胞筛选技术;④单克隆抗体特异性及ELISA方法学的考察;⑤交叉反应分析技术;⑥单克隆抗体的生产与纯化技术。

人工抗原与包被原的合成及鉴定技术与抗体特异性和灵敏度直接关联。针对中药成分结构多样性的特点,建立了多种结构类型的、20多种中药小分子的人工抗原合成方法,研究结果已陆续发表<sup>[8-12]</sup>。在人工抗原鉴定方面,除了一般采用的飞行时间质谱、紫外光谱等方法,研究过程中提出了快速薄层法鉴定人工抗原是否偶联成功的方法<sup>[9]</sup>。虽是一个极简单的改进,但在实际研究过程中却发挥了巨大作用;分泌单克隆抗体的阳性细胞克隆筛选技术是最为关键的一步,溶解度与pH值、包被原、封闭液、抗体浓度等间接竞争ELISA条件决定着阳性克隆筛选的准确性,特别是假阳性克隆造成的干扰在绿原酸等单抗的筛选中产生了一定影响。此外,也考察了中药ELISA免疫分析方法的重要技术参数,及与HPLC方法测定结果的一致性<sup>[13]</sup>。

## 2.2 中药小分子单克隆抗体细胞库和交叉反应化合物库的建立

团队已成功筛选出黄芩苷、栀子苷、葛根素、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、芍药苷、甘草酸等 10 余种中药小分子的阳性单克隆细胞株<sup>[8-14]</sup>，并利用腹水法大量制备出相应的特异性单克隆抗体，为将来建立我国自己的中药小分子单克隆抗体细胞库奠定了基础。同时也使研制多种成分并行检测抗体芯片，建立多种药物微量取样进行并行质量控制成为可能。

此外，由于中药成分多样，存在同源化合物及异构体化合物的现象，为了充分保障所得抗体的特异性，同时建立了含有 200 种不同结构类型的单体化合物和单味中药提取物的交叉反应筛选库，对获得抗体进行交叉反应研究。

## 3 基于中药小分子单克隆抗体的技术产品

建立在单克隆抗体基础之上的免疫分析技术 (immunoassay technique, IAT) 具有多种应用形式，如 ELISA、免疫沉淀、免疫荧光及胶体金技术等，可实现特定抗原的定性定量检测、“一步法”分离及定位等多种功能。

### 3.1 ELISA 检测试剂盒

ELISA 检测试剂盒的基础是抗原或抗体的固相化及抗原或抗体的酶标记，是最常用的免疫分析技术形式。结合在固相载体表面的抗原或抗体仍保持其免疫学活性，酶标记的抗原或抗体既保留其免疫学活性，又保留酶的活性。测定时受检标本（测定其中的抗体或抗原）与固相载体表面的抗原或抗体起反应，用洗涤的方法使固相载体上形成的抗原抗体复合物与液体中的其他物质分开，再加入酶标记的抗原或抗体，也通过反应而结合在固相载体上。此时固相上的酶量与标本中受检物质的量呈一定的比例，加入酶反应的底物后，底物被酶催化成为有色物质，产物的量与标本中受检物质的量直接相关，故可根据呈色的深浅进行定性或定量分析。ELISA 测定方法由于酶的催化效率很高，间接地放大了免疫反应的结果，使达到很高的敏感度，同时具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点，1 d 之内可以检测几百甚至上千份标本。不仅可以用来测定抗体，而且也可用于测定抗原，因此 ELISA 检测试剂盒在生物医学各领域的应用范围日益扩大。

基于中药小分子单克隆抗体的 ELISA 检测方法，可以实现同时检测或分析多种中药成分在同一

生物样品或多器官、组织样品中的量或是否存在，所测样品不需前处理，或只需简单处理即可进行大规模检测，具有简便、快捷、灵敏特异和高通量的优点。本团队利用自主制备的黄芩苷、栀子苷、葛根素等 ELISA 分析试剂盒，成功实现了小鼠清醒状态下尾尖微量取血仅 5  $\mu$ L 即可用于检测，可做到 72 h 内连续测定 24 个时间点以上，解决了以往依赖比格犬等大动物、检测时间点有限的代谢研究难题，并且可实现同一样本的多成分检测。另外，该方法不仅适合血液样本的检测，同样适用于体液及组织液中多种类型、痕量的中药成分检测，如健康人唾液中葛根素的药物浓度的连续检测，对于临床药物监测及中药复方配伍机制的研究具有重要意义<sup>[15]</sup>。

### 3.2 免疫亲和色谱柱

免疫亲和色谱柱是将抗体通过连接臂结合在固相介质上，这种固相化的抗体将只和与其有生物特异亲和性的抗原分子相结合，其他生物分子因不被吸附而流出色谱柱，从而达到分离纯化的目的。由于免疫亲和谱利用的是生物学特性，其选择性强、纯化效率高，可一步获得满意的纯化效果。本团队利用获得的葛根素单抗制备葛根素免疫亲和色谱柱，将葛根总提取液过柱后，不仅“一步法”分离得到了质量分数近 100% 的葛根素，而且获得了葛根素特异性敲除后的葛根提取液，操作过程快速、简便，节约人力且避免了有机溶剂的大量使用，并且色谱柱可重复利用，能够实现规模化生产。这对高纯度中药标准品的大量获得，以及中药药效物质基础的研究意义重大<sup>[16-17]</sup>。

如果以中药毒性成分的单抗制备免疫亲和色谱柱，则可实现有毒物质的高效特异性去除，保障临床用药安全。

### 3.3 胶体金试纸

20 世纪 90 年代初，在免疫渗透技术的基础上建立了一种快捷简单的胶体金试纸免疫色谱技术。胶体金是氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub>) 的水溶胶，质量好的胶体金溶液呈红色，在碱性条件下带负电荷，与蛋白质分子的正电荷基团产生静电吸引，从而牢固结合。试纸一般采用双抗体夹心的方式，属于一步式固相膜反应。以硝酸纤维素膜为载体的试纸被滴加样品溶液后，利用微孔膜的毛细血管作用，溶液中的抗原随溶液爬行至结合垫处，与其中的胶体金标记抗体 1 反应形成红色的抗原抗体复合物，然后继续层析移动向前。在观察窗口的检测线 (T) 处，红色

免疫复合物中的抗原被此处预先包被抗体 2 捕获并截留下来, 随着红色复合物截留量增多, 逐渐形成一条红线, 因此根据红色 T 线的出现即可判定样品溶液为阳性。如果样品中没有抗原, 则不形成免疫抗原抗体复合物, 流过 T 处, 不发生捕获截留, T 处保持白色, 判定为阴性。

胶体金试纸的代表性产品是早早孕试纸, 使用极其简便、快速、灵敏, 非专业人员按照说明步骤即可完成操作。利用胶体金技术制备中药成分胶体金试纸, 则可在田间地头、流通市场实现中药材的现场真伪鉴别和快速分级, 也可实现中药珍贵药材新资源考察时的野外作业现场初筛。

### 3.4 荧光标记抗体

免疫荧光标记技术创始于 20 世纪 40 年代初, 将抗原抗体反应的特异性和敏感性 with 显微示踪的精确性相结合。以荧光素作为标记物, 与已知的抗体 (或抗原) 结合, 但不影响其免疫学特性。然后将荧光素标记的抗体 (或抗原) 作为标准试剂, 用于检测和鉴定未知的抗原 (或抗体)。在荧光显微镜下, 可以直接观察呈现特异荧光的抗原抗体复合物及其存在部位。荧光素标记的中药小分子抗体进入生物体内后, 在荧光显微镜下可以直接观察到其特异性分布部位, 实现靶器官, 甚至细胞、亚细胞定位, 为作用靶点的寻找提供线索。将葛根素单克隆抗体纯化后进行荧光蛋白标记, 与人脐静脉内皮细胞充分孵育, 荧光倒置显微镜下观察到细胞核膜上有明显的特异性荧光产生, 提示葛根素的作用靶点可能特异性分布在细胞核膜上。

### 3.5 抗体芯片

将已知抗体通过阵列点样机或阵列复制器准确、快速、定量和有序地点加在硅片等载体上, 经洗涤和封闭后制成抗体芯片, 可用于特定药物的检测。由于抗体活性保持受多种条件的限制, 目前抗体芯片技术尚难推广, 但随着工程抗体技术以及仪器自动化等学科的发展, 此项新技术有望在未知药物成分高通量检测和有效药物筛选方面取得巨大突破。

而将已知的中药小分子人工抗原通过阵列点样机或阵列复制器准确、快速、定量和有序地点加在硅片等载体上, 经洗涤和封闭后也可制成芯片, 可用于特定抗血清如中药过敏患者血清的过敏成分追查。这是检测中药注射剂的过敏反应是否与中药成分直接相关的最佳方法。此外, 敏感体质病人常对某些常用中药产生个体过敏反应, 也可采用用药前

皮试的方法建立中药制品的过敏预警机制<sup>[18]</sup>。

## 4 结语

免疫分析技术目前有多种模式供选择, 灵活多样, 新的分析手段层出不穷, 这是几十年来对 IAT 的研究经久不衰的重要原因。基于中药小分子单克隆抗体的相关技术产品, 在中医药的基础研究、临床研究, 以及从中药药材、饮片、原料药到最终中药产品整个生产过程中都发挥着重要作用, 显示出极大的技术优势和广阔的应用前景。

## 参考文献

- [1] Kohler G, Nature C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256(4): 495-497.
- [2] 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.
- [3] Yau K Y, Lee H, Hall J C. Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies [J]. *Biotechnol Adv*, 2003, 21(7): 599-637.
- [4] 易 喻, 汪竹环, 朱克寅, 等. 氯霉素单克隆抗体的制备与纯化 [J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(1): 23-26.
- [5] Chen H Y, Zhuang H S, Yang G X, *et al.* Development of a new polyclonal antibody for the determination of polychlorinated biphenyls in indoor air by ic-ELISA [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20: 2244-2251.
- [6] Tian M, Tanaka H, Shang M Y, *et al.* Production, characterization of a monoclonal antibody against aristolochic acid-II and development of its assay system [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(2): 425-436.
- [7] Tanaka H. Immunochemical approach using monoclonal antibody against  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid (THCA) to discern cannabis plants and to investigate new drug candidates [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2011, 8: 3-15.
- [8] 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.
- [9] 刘 洋, 屈会化, 任 燕, 等. 人参皂苷 Rg<sub>1</sub> 人工抗原的合成及免疫原性鉴定 [J]. *中草药*, 2013, 44(13): 1738-1742.
- [10] 屈会化, 张桂亮, 赵 琰, 等. 栀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.
- [11] 薛 瑾, 屈会化, 张 越, 等. 绿原酸人工抗原的合成及多克隆抗体的制备 [J]. *中草药*, 2014, 45(4):

- 480-484.
- [12] 万 凤,孔 慧,屈会化,等.紫柳素人工抗原的合成与鉴定 [J].中草药,2014,45(3):337-340.
- [13] 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.
- [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] 屈会化,赵 琰,王庆国.基于中药活性小分子单克隆抗体的复方配伍机理研究新思路 [J].中国中西医结合杂志,2012,32(10):1418-1421.
- [16] 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.
- [17] Qu H H, Zhang G L, Li Y F, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay based on anti-puerarin monoclonal antibody and its applications [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 953/954: 120-125.
- [18] 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.